

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Untersuchungen zur Expression
von Adenosin-Rezeptoren
und Enzymen des Adenosin-Stoffwechsels
auf der Oberfläche menschlicher
lymphoider Zellen**

von

Rudolf Napieralski

aus München

2002

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinn von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Wolf Gutensohn betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 15.01.2002

.....

(Rudolf Napieralski)

Dissertation eingereicht am 24.08.2001

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolf Gutensohn
2. Gutachter: Prof. Dr. Horst Domdey

Mündliche Prüfung am 20.12.2001

In Memoriam

Peter Weinzierl

(05.02.1965-15.10.1999)

Danksagung

Herzlichen Dank möchte ich aussprechen an,

Herrn Prof. Dr. Wolf Gutensohn für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe Biochemische Humangenetik des Instituts für Anthropologie und Humangenetik bearbeiten zu können. Ganz besonders möchte ich mich für die große Hilfsbereitschaft, Diskussionsfreude und Einsatz während der letzten 4 Jahre und gerade in der Endphase dieser Doktorarbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Horst Domdey für seine Hilfsbereitschaft und die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie.

Herrn Prof. Dr. Emmerich, Leiter der Abteilung Hämato-Onkologie des Klinikums Innenstadt, Herrn Prof. Dr. B. Hallek und Frau Dr. S. Adler für die Ermöglichung der klinischen Studie zur chronisch lymphatischen Leukämie, die in unserem Labor durchgeführt wurde.

Herrn Prof. Dr. T. Cremer, an dessen Institut ich diese Arbeit machen durfte, für seine stete Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Fritz der Abteilung Klinische Chemie des Klinikums Innenstadt und Herrn Prof. Dr. Meitinger der ehem. pädiatrischen Genetik der Poliklinik für die finanzielle Unterstützung bei der Weiterführung dieser Arbeit.

Ebenso geht mein Dank an die Sander- und die Else Kröner-Fresenius-Stiftung für die finanzielle Ermöglichung dieser Doktorarbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Bettina Kempkes (GSF; Hämatologikum) für die Bereitstellung der induzierbaren 493-6-Zelllinie.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Heidi Jahn-Henninger bedanken, die mich immer wieder anspornte, mit ihrer umfangreichen praktischen Erfahrung immer wertvolle Tips gab und mich unterstützte und immer vergeblich versuchte Ordnung in mein Chaos zu bringen. Vielen Dank für die letzten 4 Jahre.

Ebenso gilt mein Dank den Leuten der Arbeitsgruppe Daniele Zink, ganz besonders an Nikolas Sadoni, die mir alle besonders bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung zur Seite standen.

Herrn Dr. A. Koch (Abteilung Prof. Fritz) möchte ich für die Tips und Unterstützung bei der Etablierung der semiquantitativen RT-PCR danken, ebenso den Personen der Arbeitsgruppe Prof. Weiß, besonders Valeska Hofmeister, die mir viele wertvolle Hinweise in Bezug auf nichtradioaktive Blotting-Methoden gaben.

Auch möchte ich mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Speicher, wie auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Anthropologie und Humangenetik für ihre Kameradschaft und Hilfsbereitschaft danken und für die Möglichkeit, Einblicke in ihre Forschungsgebiete nehmen zu können.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie bedanken, ohne deren Unterstützung und Enthusiasmus diese Arbeit ebenfalls nicht möglich gewesen wäre. Diese Arbeit ist auch ihnen und ganz besonders meinen Großeltern gewidmet.

Abkürzungen

Nukleotide:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

N = A, C, G oder T

NTP	Nukleotidtriphosphat
NDP	Nukleotiddiphosphat
NMP	Nukleotidmonophosphat
dNTP	Desoxy-Ribonukleotidtriphosphat
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
dUTP	Desoxy-Uridintriphosphat
ddNTP	di-desoxy-Nukleotidtriphosphate
Dig-dUTP	Digoxigenin-11-2'-deoxy-uridin-5'-triphosphat

Aminosäuren:

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gly	Glycin
R	Arg	Argenin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

CD Zelldifferenzierungs-Marker („Cell determinant“):

CD3/TCR	T-Zellrezeptor
CD4	T-Zellantigen
CD5/BCR	B-Zellrezeptor
CD8	cytotoxische T-Lymphozyten-Antigen
CD19 gp95	Komponente des proliferativen Signaltransduktionsweges
CD22	BL-CAM; Zelladhäsions-Molekül
CD23	niedrigaffiner IgE-rezeptor
CD26	Dipeptidyl-Peptidase IV
CD38	„cyclic ADP ribosyl cyclase“ interagiert mit ADA
CD45	Tyrosin-Phosphatase
CD73	5'-Ectonukleotidase
CD95/Fas	Fas-Signaltransduktionssystem

Mengenangaben:

amol	Attomol
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol pro Liter
µmol	Mikromol
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
g	Gramm
kg	Kilogramm
l	Liter
M	Molar (mol/Liter)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar (10^{-3} mol/Liter)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
Pmol	Picomol
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent

2

2CA	2-Chloro-Adenosin
-----	-------------------

A

A	Amper
A1H	A1AdoR-HeLa-Transfektante
AC	Adenylylcyclase
Ach	Acetylcholin

A1CHO
ADA
Ado
AdoR
AK
AKT/PKB
Amp
AMV
AP1
As
ATM

A1AdoR-CHO-Transfektante
Adenosin-Desaminase
Adenosin
Adenosin-Rezeptor
Antikörper
Proteinkinase B
Ampicilin
Avian Myeloblastosis Virus
Transkriptionsfaktor-Komplex aus c-Jun und c-fos
Aminosäure
Ataxa telangiectasia mutated

B

BCI2
bidest.
BL
BP
BSA
bzw.

antiapoptotisches mitochondriales Protein
bidestiliert
Burkit Lymphom
Basenpaar(e)
Rinderserumalbumin
beziehungsweise

C

ca.
CaM
cAMP
cDNS
c-fos
CFTR
CGH
CGS21680

circa
Calmodulin
3',5'-cyclo-Adenosin-Monophosphat
Zur mRNS komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Transkriptionsfaktor
„cystic fibrosis conductance Regulator“
„Comparative Genome Hybridisation“
2-p-(2-Carboxyethyl)phenethylamino-5'-N-ethylcarboxamidoadenosin
„Chinese Hamster ovary“-Zelllinie
Chromosom
Transkriptionsfaktor
intrazellulärer „Loop“
chronisch lymphatischen Leukämie
Cyto-Megalo-Virus
Proto-Onkogen; Transkriptionsfaktor
„cAMP responsive Element Binding Protein“
C-Terminus
Cytochrom c

CHO
Chros.
c-Jun
CL
CLL
CMV
c-myc
CREB
C-Term.
cytc

D

d
DAG
DAPI
DBM
DEPC
Dig

Tag
Diacyl-Glycerin
4', 6-Damidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid
„Disrupted in B-Cell malignancies“
Diethylpyrocarbonat
Digoxigenin

DMSO
DNS
dsDNS
DTT

Dimethylsulfoxid
Desoxyribonukleinsäure
doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
Dithiothreitol

E

E. coli
EBNA2
EC₅₀

Escherichia coli
Eppstein-Barr Nukleäres Antigen 2
Halbmaximale Belegungskonzentration eines
Rezeptors
Ethylendiamintetraacetat
„enhanced“ Grün fluoreszierendes Protein
„Enzym Immuno Assay“
Extrazellulärer „Loop“
Endkonzentration
Extrazellulär regulierten Kinasen
Ethylalkohol
eventuell
Excitatorisch
Exonuklease negativ

EDTA
EGFP
EIA
EL
Endkonz.
ERK1/2
EtOH
evtl.
exc.
exo⁻

F

FCS
FITC

Fötales Kälberserum
Fluoresceinisothiocyanat

G

g
G_{βγ}
G_{αi}
G_{αs}
GABA
GAPDH
GFP
G_i/G₀
Glykosyl.
GPI
G_q
GRK

Erdfeldbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$)
G-Protein $\beta\gamma$: modulierende Untereinheit
G-Protein α : Inhibierende Untereinheit
G-Protein α : Stimulierende Untereinheit
 γ -Amino-Buttersäure
Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
Grün fluoreszierendes Protein
„Gap-Phase“ des Zellzyklus
Glykosylierung
Glycyl-Phosphatidyl-Inositol
G-Protein q
G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase

H

h
HeLa
HEPES
HSC73
Hypometh.

Stunden
Helen Laury-Zelllinie
N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hitzeschockprotein
Hypomethylierung

I

I κ B	Inhibitor kappa B (von NF κ B)
IgH-Lokus	Immunglobulin H -Genlokus
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
Inh.	Inhibierung
Inst.	Institut
IP ₂	Inositol-Diphosphat
IP ₃	Inositol 1,4,5-Triphosphat
IP ₃ ase	Inositol-triphosphatase

K

KAc	Kaliumacetat
Kan	Kanamycin
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
kB	Kilobase(n)
kD	Kilo-Dalton (Dalton: atomare Masseneinheit = 1,660 x 10 ⁻²¹ Gramm)
Koeff	Koeffizient
Komp.	Kompetitor
Konz.	Konzentration

L

L1	Basenpaarleiter 1
LB	Luria-Bertoni
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
Leuk.	Leukozyten

M

mA	Milliamper
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinasen
MCS	Multiple Klonierungsstelle
MDM2	Modulator der P53-Aktivität
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex
Min.	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert

N

N ₂	Stickstoff
NEB	„New England Biolab“
NECA	5'-N-Ethyl-Carboxamido-Adenosin
Neo ^R	Neomycin-Resistenz
NF κ B	Transkriptionsfaktor
NF-AT	Nuklearer Faktor aktivierter Thymozyten

NF-ATp	Nuklearer Faktor aktivierter Thymozyten
NK	P-Untereinheit
NOS	Natürliche Killerzellen
N-Term.	NO-Synthase
	N-Terminus

O

o.g.	oben genannte
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 Nanometer
ORF	„Open Reading Frame“ Kodierender Leseraster
ORI	Replikationsursprung

P

P	Phosphorylierung
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBSII	pBluescript II-Klonierungsvektor
P _{CMV}	CMV-Promotor
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pdase	Phosphodiesterase
PEG 4000	Polyethylenglykol 4000
PGK1	Phosphoglycerat-Kinase 1
PIP ₂	Phosphatidyl-Intositol-Diphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
Pol.	Polymerase
pRc/CMV	Expressionsvektor mit CMV-Promotor
Prom.	Promotor
PS	Phosphatidyl-Serin
Pwo	Pyrococcus woesei

R

R ²	Quadrat der Signifikanz einer linearen Regression
RBP-Jκ	Modulator des NFκB-Signalweges
RDX	Radixin
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
Ro 20-1724	(4-[(3-Butoxy4methoxyphenyl)methyl]2imidazolidinon
R-PIA	(R)-N6-(1-Methyl-2-phenylethyl)adenosin
rRNS	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion

S

SCID	„severe combined immuno deficiency“ Schwere Immundefizienz
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-NaOH	Sodiumdodecylsulfat-Natronlauge
Sek.	Sekunde
SP1	Transkriptionsfaktor
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
ssRNS	einzelsträngige Ribonukleinsäure
STAT	„Signal transducer and activator of transcription“
Stim.	Stimulierung
SV40	Simian Virus 40

T

t	Zeit
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
Tab.	Tabelle
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tet	Tetracyclin
Tet-off	durch Tetracyclin abschaltbares Induktionssystem
TGF β	„Tumor growth factor“ β
T_m	Schmelztemperatur der DNS
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TP53	Tumorsuppressorgen 53
transkr.	transkriptionell
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSH	Thyrotropin (Thyroid stimulierendes Hormon)
TSS	Transfektions- und Aufbewahrungs-Lösung
tTA	tetracyclin-kontrollierter Transaktivator

U

U	Unit (enzymatische Einheit)
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UE	Untereinheit
unveröff.	unveröffentlicht
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht

V

V	Volt
---	------

W

wt	Wildtyp
----	---------

Z

z.B.

zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	4
2.1 Signalwege des Adenosins	6
2.2 Physiologische Rolle der Adenosin-Rezeptoren	7
2.3 Molekulare Charakterisierung der Adenosin-Rezeptoren	9
2.3.1 Proteinstruktur der AdoR	9
2.4 Regulation der AdoR-Aktivität	10
2.4.1 Regulation der Aktivität Adenosin-verarbeitender Enzyme	10
2.4.2. Regulation der Transkription der AdoR-Gene	10
2.4.3 Posttranslationale Regulation	11
2.4.4 Desensibilisierung und Internalisierung	11
2.5 AdoR-Interaktionen	11
2.6 Charakterisierung der Ecto 5'-Nukleotidase (CD73)	12
2.7 AdoR-Signaltransduktion in der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL)	13
2.7.1 Chromosomen-Anomalien der CLL	13
2.7.2 Signaltransduktionswege moduliert in der CLL	14
2.7.3 Mitogene Signale und ihre Verschaltung mit dem AdoR-Signalweg	16
3 Aufgabenstellung	17
4 Material	18
4.1 Chemikalien	18
4.1.1 AdoR-Agonisten	19
4.1.2 DNS-Längenstandard	19
4.2 Geräte	19
4.3 Reagenziensätze und Kits	20
4.4 Bakterien-Stämme	20
4.5 Zelllinien	20
4.6 Enzyme	21
4.7 Oligonukleotide	21
4.7.1 Klonierungs-Primer	21
4.7.1.1 Adapterprimer	22
4.7.1.2 Sequenzierprimer (für pBS II SK (-)-Konstrukte)	22
4.7.2 RT-Primer	23
4.7.3 RT-PCR-Primer	23
4.7.4 Kompetitoren-Primer	24
4.7.5 Northern-Blot-Primer	24
4.8 Vektoren	25
4.8.1 Fusionskonstrukt-Vektoren	25
4.8.2 Klonierungs-Vektoren	26
4.9 Etablierte Konstrukte	27
5 Methoden	28
5.1 Zellkultur	28
5.1.1 Allgemeine Anzuchtbedingungen	28
5.1.2 Transfektion	28
5.1.3 Einfrieren und Auftauen	29

5.1.4 Induktionsexperimente in der Zellkultur	29
5.1.4.1 HeLa, Raji, Jurkat	29
5.1.4.2 Das induzierbare Zellsystem 493-6	31
5.2 Bakterienkultur	31
5.2.1 Darstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Kulturen	32
5.2.2 Transformation	32
5.2.3 Glycerinkulturen.....	32
5.3 Kompetitiver Immunoassay zur Messung der Adenosin 3', 5'-cyclo- Monophosphat-Konzentration	33
5.3.1 Vorbereitung der Zellen	33
5.3.2 Inkubation der Zellen	33
5.3.3 Vorbereitung der Standardreihe	33
5.3.4 Vorbereitung der Wellslots	34
5.3.5 Berechnung der Ergebnisse	35
5.4 Präparation von DNS	35
5.4.1 Plasmidisolierung	35
5.4.2 Bestimmung der DNS/RNS-Konzentration	37
5.4.3 Restriktionsverdaus	37
5.4.4 Ligation.....	37
5.4.5 Elektrophoretische Auftrennung der DNS-Fragmente.	38
5.4.6 Isolation von DNS aus Agarosegelen	38
5.4.7 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	38
5.5 Arbeiten mit RNS	39
5.5.1 Isolierung von Leukozyten-RNS aus Patientenblut.....	39
5.5.2 Isolierung aus der Zellkultur.....	40
5.5.3 Northern-Blot-Analyse der RNS-Expression.....	40
5.5.3.1 Denaturierende Gelelektrophorese.....	40
5.5.3.1.1 Herstellung des Agarosegeles	40
5.5.3.1.2 Probenvorbereitung	40
5.5.3.2 Northern Blot	41
5.5.3.3. Nichtradioaktive Hybridisierung	42
5.5.3.3.1 Prähybridisierung.....	42
5.5.3.3.2 Vorbereitung der Dig-Sonden	42
5.5.3.3.3 Hybridisierung.....	42
5.5.3.4 Waschen der Proben.....	43
5.5.3.5. Immundetektion	43
5.5.3.5.1 Blockierung der freien Bindungsstellen auf den Probenmembranen..	43
5.5.3.5.2 Auftragung des Anti-Digoxigenin-AK-Fab-Fragments.....	43
5.5.3.5.3 Herstellung der Chemilumineszenzsubstratlösung 5.....	43
5.5.3.5.4 Detektion der Chemilumineszenz	43
5.6 Polymerase-Kettenreaktion	45
5.6.1 „Colony-PCR“ mit Taq-Polymerase	45
5.6.2 Expand™ High Fidelity PCR System.....	46
5.6.3 Darstellung der Dig-dUTP-markierten Gensonden	47
5.6.4 Sequenzierung klonierter PCR-Produkte.....	47
5.7 RT-PCR	48
5.7.1 Reverse Transkription	48
5.7.2 Qualitative RT-PCR	49
5.7.3 Semiquantitative, kompetitive RT-PCR	49
5.7.3.1 Herstellung der kompetitiven, heterologen DNS-Standards	50
5.7.3.2 Densitometrische Auswertung der semiquantitativen RT-PCR-Signale	52

6 Ergebnisse	53
6.1 Darstellung der EGFP-Fusionskonstrukte	53
6.1.1 A2bAdoRpEGFP-N1	53
6.1.1.1 Konstruktion des modifizierten C-Terminus	53
6.1.1.2 Etablierung des Fusions-Konstruktes in pEGFP-N1	54
6.1.2 A2aAdoRpEGFP-N1	56
6.1.2.1 Konstruktion des modifizierten C-Terminus	56
6.1.2.2 Etablierung des A2aAdoR-Fusions-Konstruktes in pEGFP-N1	57
6.1.3 A3AdoRpEGFP-N1	59
6.1.3.1 Konstruktion des modifizierten C-Terminus	59
6.1.3.2 Etablierung des A3AdoR-Fusions-Konstruktes in pRc/CMV	59
6.1.3.3 Etablierung des A3AdoR-Fusions-Konstruktes in pEGFP-N1	60
6.1.4 A1AdoRpEGFP-N1	62
6.1.4.1 Konstruktion des modifizierten C-Terminus	62
6.1.4.2 Etablierung des A1AdoR-Fusions-Konstruktes in pEGFP-N1	62
6.2 Etablierung stabiler Zelllinien	64
6.2.1 HeLa-Transfektanten	64
6.2.1.1 Nachweis mittels des EGFP-Anhangs	64
6.2.1.2 Ergebnisse der RT-PCR	64
6.2.2 CHO-Transfektanten	66
6.2.2.1. Nachweis des EGFP-Anhangs	66
6.2.2.2 Ergebnisse der RT-PCR	67
6.2.2.3 Nachweis der Funktionalität des A1AdoR-EGFP-Konstruktes in CHO über Stimulus-abhängige Internalisierungsmechanismen.	67
6.3 Etablierung der Semiquantitativen RT-PCR	70
6.3.1 Etablierung des heterologen Standards	70
6.3.2 Nachweis der Spezifität der jeweiligen semiquantitativen RT-PCR-Systeme	72
6.3.2.1 Spezifität zur cDNS	72
6.3.2.2 Spezifität zum jeweiligen AdoR-Subtyp	72
6.3.3 Empfindlichkeit der semiquantitativen RT-PCR	73
6.3.3.1 Kinetik der Amplifikation der jeweiligen RT-PCR-Systeme	73
6.3.3.2 Konzentrationsreihen	75
6.4 Untersuchungen in den HeLa-Transfektanten	77
6.4.1 cDNS-Niveaus der HeLa-Transfektanten	77
6.4.2 Induktionsexperimente in den HeLa-Transfektanten	79
6.4.2.1. Excitatorische AdoR-HeLa-Transfektanten	79
6.4.2.2. Inhibitorische AdoR-HeLa-Transfektanten	81
6.5 Induktionsexperimente in der Raji-Zelllinie	83
6.6 Das Modellsystem der 493-6 Zelllinie	85
6.6.1 Vergleich der mRNS-Niveaus diverser Schlüsselkomponenten des AdoR- Signalweges in der 493-6 Zelllinie	85
6.6.1.1 Semiquantitative RT-PCR	85
6.6.1.2 Northern Blot	88
6.6.2 Untersuchung der cAMP-Signalstärke in stimulierten Proben der verschiedenen Induktionsniveaus	90
6.7 Studien zur CLL	92
6.7.1 Daten zu Patienten und Kontrollen	92
6.7.2 Abweichungen der Expressionsniveaus der Ado-Signalkomponenten in der CLL	93

6.7.3 Korrelationen innerhalb der untersuchten Gene/Enzyme	95
6.7.3.1 Leukozytenanzahl.....	97
6.7.3.2 Binet-Stadien	98
6.7.3.3 CD73-Aktivität.....	100
6.7.3.4 A1AdoR	101
6.7.3.5 A2aAdoR	102
6.7.3.6 A2bAdoR	103
6.7.3.7 A3AdoR	103
6.7.3.8 Alter	104
6.7.4 Langfristige Änderungen der Expressionsniveaus bei Wiederholungsuntersuchungen.....	105
6.7.5 Immunphänotypisierung der Patientenproben	106
7 Diskussion	107
7.1 Etablierung der semiquantitativen RT-PCR	107
7.2 Darstellung der Fusionskonstrukte.....	107
7.3 Transfektanten und Modellsysteme	108
7.3.1 HeLa-Transfektanten.....	108
7.3.2 CHO-Zelllinie	111
7.3.3 Raji-Zelllinie	111
7.3.4 493-6-Zelllinie	112
7.4 Klinische Studie an CLL-Patienten.....	114
7.4.1 Modulation der CD73-Aktivitäten in den Patientenproben	114
7.4.2 Wechselbeziehungen der AdoR	115
7.4.3 ADA und c-myc.....	116
7.5 Prognostische Implikationen des AdoR-Signalweges	118
8 Literaturverzeichnis.....	119
9 Anhang	136
9.1 Kodierende Sequenzen der untersuchten Gene	136
9.1.1 A1AdoR	136
9.1.2 A2aAdoR	136
9.1.3 A2bAdoR	137
9.1.4 A3AdoR	137
9.1.5 CD73	137
9.1.6 ADA	139
9.1.7 c-myc.....	139
9.2 Patientendaten	140
9.3 Daten der Kontrollgruppe	144
9.4 Meßdaten der 493-6-Zelllinie	144
10 Lebenslauf.....	147

1 Zusammenfassung

Adenosin-Rezeptoren (AdoR) zeigen als Komponenten des Adenosin-Signalweges komplexe Interaktionen untereinander, sowie mit weiteren Komponenten, wie der Ecto-5'-Nukleotidase (CD73) und der Adenosin-Desaminase (ADA). Diese Rezeptoren sind zudem mit den verschiedensten Signaltransduktionswegen verschaltet.

Innerhalb dieser Arbeit sollten mögliche Mechanismen gemeinsamer potentieller Regulationen dieser Komponenten anhand von eukaryontischen Modellsystemen, wie auch anhand einer klinischen Studie zur chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) untersucht werden.

Für die Untersuchung transkriptioneller Regulationen wurde eine semiquantitative RT-PCR mit Hilfe eines heterologen Standards für alle 4 AdoR-Subtypen (A1, A2a, A2b, A3) etabliert. Die Spezifität dieser Systeme konnte mittels Restriktionsverdaus sowie Untersuchung von Transfektanten in AdoR-freien Zelllinien („Chinese Hamster ovary“ CHO) nachgewiesen werden. Densitometrische Auswertung der Amplifikate ermöglichte eine gute Quantifizierung der untersuchten mRNS-Niveaus, die noch Unterschiede in den subtypspezifischen cDNS-Niveaus von weniger als 40% deutlich auflöste.

Für Untersuchungen in eukaryontischen Modellsystemen wurden C-terminale EGFP-Fusionskonstrukte aller 4 AdoR in pEGFP-N1 (Clontech) etabliert und in CHO- bzw. HeLa-Zelllinien transfiziert. Erfolgreicher Nachweis der Etablierung der Konstrukte erfolgte über Sequenzierung der neusynthetisierten Adaptersequenzen und über spezifische Restriktionsverdaus. Desweiteren konnte über die membranorientierte Fluoreszenzverteilung der Fusionskonstrukte in den Transfektanten auf eine erfolgreiche posttranslationale Prozessierung und Transport des Konstruktes in die Zellmembran zurückgeschlossen werden. RT-PCR-Analyse von RNS-Präparationen dieser Transfektanten zeigte eine erfolgreiche Transkription der Konstrukte.

Innerhalb der HeLa-Zelllinie konnten alle 4 Subtypen erfolgreich exprimiert werden, wobei jedoch inhibitorische AdoR (A1AdoR; A3AdoR) leichter zu transfizieren waren als die excitatorischen A2aAdoR/A2bAdoR-Konstrukte. Letztere Transfektanten zeigten deutlich höhere Tendenzen zum Absterben, was mit einem erhöhtem cAMP-Niveau dieser Zellen zusammenhängen könnte. Physiologische Aktivität des A3AdoR-Konstruktes konnte durch Verminderung der Teilungsrate der Transfektante beobachtet werden.

Innerhalb der einzelnen Transfektanten konnten keine großen Änderungen der mRNS-Niveaus des entsprechenden transfizierten Subtypen festgestellt werden, was mit einer „Downregulation“ des nativen Subtypes erklärbar sein könnte.

Jedoch zeigten sich zum Teil deutliche Niveau-Änderungen in den jeweils anderen Subtypen der Transfektante, was auf eine Interaktion der AdoR-Subtypen auf der Transkriptionsebene hindeutet. Verschiedene Wechselbeziehungen könnten mit - zum Teil von physiologischen Interaktionen her- bekannten Beziehungen der AdoR in verschiedenen Zelltypen in Zusammenhang gebracht werden.

Induktion der Transfektanten mit AdoR-Agonisten, wie 5'-N-Ethyl-Carboxamido-Adenosin (NECA) oder (R)-N6-(1-Methyl-2-phenylethyl)-Adenosin (R-PIA) ergab einen Anstieg aller AdoR-cDNS-Niveaus im Falle der Aktivierung der Adenylylcyclase (A2a/A2bAdoR), bzw. eine Abnahme bei deren Inhibierung (A1/A3AdoR), die auch zum Teil subtypabhängige Modulationen und deutliche Abweichungen zur Kontrolllinie (EGFP-HeLa) zeigte. Behandlung der Zellen mit Alkohol als apoptosistimulierendes Signal führte zu einer starken Erhöhung aller Subtyp-Niveaus, wobei

besonders die A2aAdoR- und die A3AdoR-Transfektante die größten apoptotischen Tendenzen und auch die größten Modulationen der Subtyp-Niveaus zeigten.

Transfektion der Konstrukte in die CHO-Zelllinie ergab gut exprimierende Klone der A1AdoR- und A3AdoR-Transfektante, die über membranorientierte Fluoreszenz des EGFP-Anhanges, wie auch über Nachweis der mRNA nachgewiesen werden konnten. Im Falle der excitatorischen AdoR erhielt man nur schwach exprimierende Klone der A2aAdoR-Transfektante, die deutliche Tendenzen zum Absterben zeigte. Wiederum fand man bei der A3AdoR-Transfektante einen erheblich verlangsamten Zellzyklus, was auf einer zellzyklusmodulierenden Wirkung des A3AdoR in verschiedenen Zelltypen beruht und somit auf eine erfolgreiche Signalfortleitung in der Transfektante hindeutet.

Induktion der A1AdoR-Transfektante führte zu einer zeitabhängigen Konzentrierung und Internalisierung der Fluoreszenz, was auf eine intakte Regulation und Desensibilisierung dieses Subtypes innerhalb dieses Klonen hindeutet.

Die B-lymphoblastoide Zelllinie Raji wurde als Modellsystem für AdoR-Signalwege innerhalb des lymphatischen Systems untersucht. Eine starke Präsenz des A2aAdoR konnte mittels RT-PCR nachgewiesen werden, dessen Stimulation mit dem AdoR-Agonisten NECA wiederum zu einem Anstieg der mRNA-Niveaus aller AdoR-Subtypen führte. Behandlung mit Alkohol führte zu einem größeren Anteil an absterbenden Zellen sowie zu einem leichten Anstieg aller AdoR-Subtypen und deutet wiederum auf eine Beteiligung der AdoR an apoptotischen Antworten hin.

Inwiefern substratmodulierende Komponenten des AdoR-Signalweges, insbesondere CD73 und ADA, in Regulationsmechanismen dieses Weges integriert sind, wurde in einem induzierbaren B-lymphoblastoiden Modellsystem, der 493-6-Zelllinie untersucht. Hierbei wurden durch induzierbare transkriptionelle Aktivierung zweier Mitogene, c-myc und EBNA2, vier unterschiedliche proliferative Zustände erzeugt und die Auswirkungen auf die Komponenten des Ado-Signalweges untersucht.

Northern Blot-Analyse der 4 Zustände zeigten eine Zunahme der CD73- und A2aAdoR-mRNA-Niveaus mit sukzessiver Abschaltung der Mitogene, wobei EBNA2-Abschaltung den deutlichsten Effekt zeigte. ADA-mRNA-Niveaus zeigten meistens eine leichte Abnahme mit Abschaltung der Mitogene, was aber nicht eindeutig bestätigt werden konnte. Untersuchung der Zustände mit semiquantitativer RT-PCR ergaben eine Präsenz aller AdoR mit einer starken Überrepräsentierung des A2aAdoR. Wiederum konnte mit sukzessiver Abschaltung der Mitogene ein deutlicher Anstieg des A2aAdoR beobachtet werden, der wiederum deutlicher bei Abschaltung von EBNA2 ausfiel. Andere AdoR-Subtypen zeigten jedoch so gut wie keine Respons. Abschaltung der Mitogene führte sowohl bei EBNA2, wie auch bei c-myc nach ca. 3 bis 6 Stunden zu einem deutlichen Anstieg der A2aAdoR-Niveaus, sowie generell zu einer Abnahme des ADA-Niveaus im Falle der c-myc-Abschaltung. NECA-abhängige Erhöhung des cAMP-Niveaus korrelierte mit den A2aAdoR-Niveaus der entsprechenden Proben. Ebenso konnte in diesem Labor eine Erhöhung der CD73-Aktivität mit Abschaltung der Mitogene nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine Rolle des A2aAdoR bei der Bereitstellung mitogener Signale und einer damit verbundenen Gewährleistung des Überlebens dieser Zelllinie bei inaktivierten Mitogenen, sowie auf modulatorische Interaktionen zwischen der CD73 und A2aAdoR hin.

Modulierte CD73-Aktivitäten und Beteiligung der AdoR an apoptotischen Vorgängen in der chronisch lymphatischen Leukämie sind bereits länger bekannt. Innerhalb einer klinischen Studie zur CLL wurden 48 Patienten und 10 Kontrollpersonen auf Modulationen der AdoR-, sowie c-myc- als auch ADA-Niveaus, untersucht und auf eine klinische Relevanz hin überprüft.

Im Bezug auf den Mittelwert der Kontrollgruppe konnten oft Modulationen der mRNS-Niveaus der untersuchten Komponenten innerhalb der Patientengruppe gefunden werden. Korrelationsanalyse der Patientendaten ergab verschiedene Zusammenhänge der AdoR, wie auch der c-myc und der ADA untereinander, die zum Teil gegenläufig zu denen in der Kontrollgruppe waren. A2aAdoR-Niveaus korrelierten negativ mit der Leukozytenanzahl, einem Marker der CLL. Es konnte auch ein deutlicher Zusammenhang zwischen der CD73-Aktivität und der Leukozytenanzahl in diesem Labor gezeigt werden.

Ebenso fand man einen starken Zusammenhang zwischen den c-myc- und ADA-Niveaus, sowie zwischen der ADA bzw. c-myc und diversen AdoR-Subtypen. Diverse, aus physiologischen Zusammenhängen bekannte Korrelationen fand man auch in der CLL wieder, was auf eine geregelte Modulation der AdoR-Niveaus in der CLL hindeutet, wobei jedoch keine Zusammenhänge mit den prognostischen Stadien nach Binet gefunden werden konnten.

Ein aktive Modulation des A2aAdoR bei der Expansion der malignen B-Lymphozyten konnte anhand der Ergebnisse von 4 Folgeuntersuchungen vermutet werden. Wiederholung der Untersuchung nach 6 Monaten bis zu 1,5 Jahren zeigte eine deutliche negative Korrelation der Leukozytenzahl mit dem A2aAdoR-Niveau.

2 Einleitung

Kommunikation auf zellulärer Ebene ist eine unabdingbare Voraussetzung für die Entwicklung und Stabilität mehrzelliger Organismen.

In den letzten Jahren konnten viele Hinweise für eine wichtige Rolle von Nukleotiden und Nukleosiden an verschiedenen zellregulatorischen Prozessen gesammelt werden. So spielen Nukleotide, wie auch Nukleoside eine große Rolle bei der auto-krienen oder parakrienen Regulation unterschiedlichster Antworten auf extrazelluläre Signale in den verschiedensten Geweben.

Adenosin ist z.B. beteiligt an antiinflammatorischen Wirkungen (Linden *et al.* 2001), Modulation des Immunsystems (Apasov *et al.* 1995), Regulation des Blutdrucks (Kleppisch *et al.* 1995), Signalfortleitung cholinерger (Cunha *et al.* 1994) und dopaminерger Synapsen und ischämischer Präkonditionierung des Herzens und des Gehirns (Vinten-Johansen *et al.* 1999). Ebenso kann Adenosin als Ligand auf den Glukosestoffwechsel Einfluß nehmen (Hillaire-Buys *et al.* 1994), sowie apoptotische Vorgänge (Chow *et al.* 1997), wie auch Zellwachstum und/oder –Differenzierung beeinflussen (Abbracchio *et al.* 1997).

Vermittelt werden die betreffenden Signale häufig über Rezeptoren, die zu der großen Familie der Nukleosid- (P1) bzw. Nukleotid-Rezeptoren (P2) gehören (Fredholm *et al.* 1994)

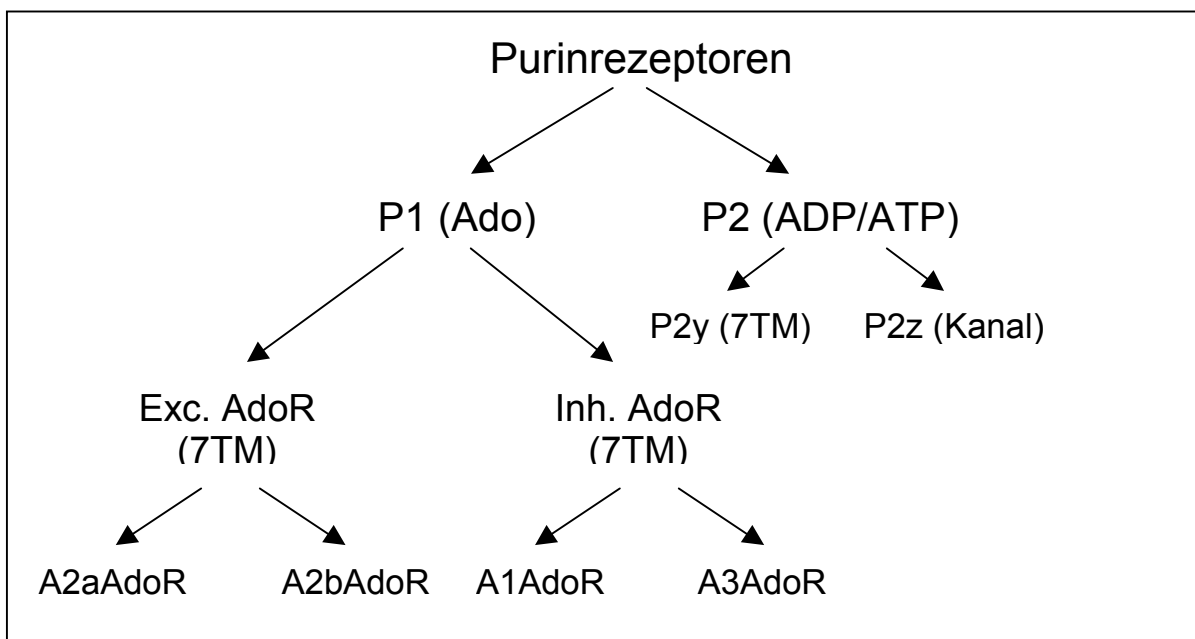


Abb. 1: Einteilung der Purinrezeptoren.

Man unterscheidet 2 Familien der Nukleosid-Rezeptoren (P1), die Adenosin (Ado) als Substrat haben, und die relativ heterogene Familie der Nukleotidrezeptoren, deren Liganden Nukleosiddi- oder Triphosphate sind (P2). Letztgenannte Gruppe enthält unter anderem ATP-regulierte Ionenkanäle (P2z) oder NDP-spezifische G-Protein-gekoppelte 7-Transmembrandomänen-Rezeptoren (P2y).

Ado-Rezeptoren werden unterteilt in die G_{os} -gekoppelten, excitatorischen A2AdoR (A2aAdoR; A2bAdoR) und die G_{oi} -gekoppelten, Adenylylcyclase-inhibierenden AdoR (A1AdoR, A3AdoR), (LeVine 1999).

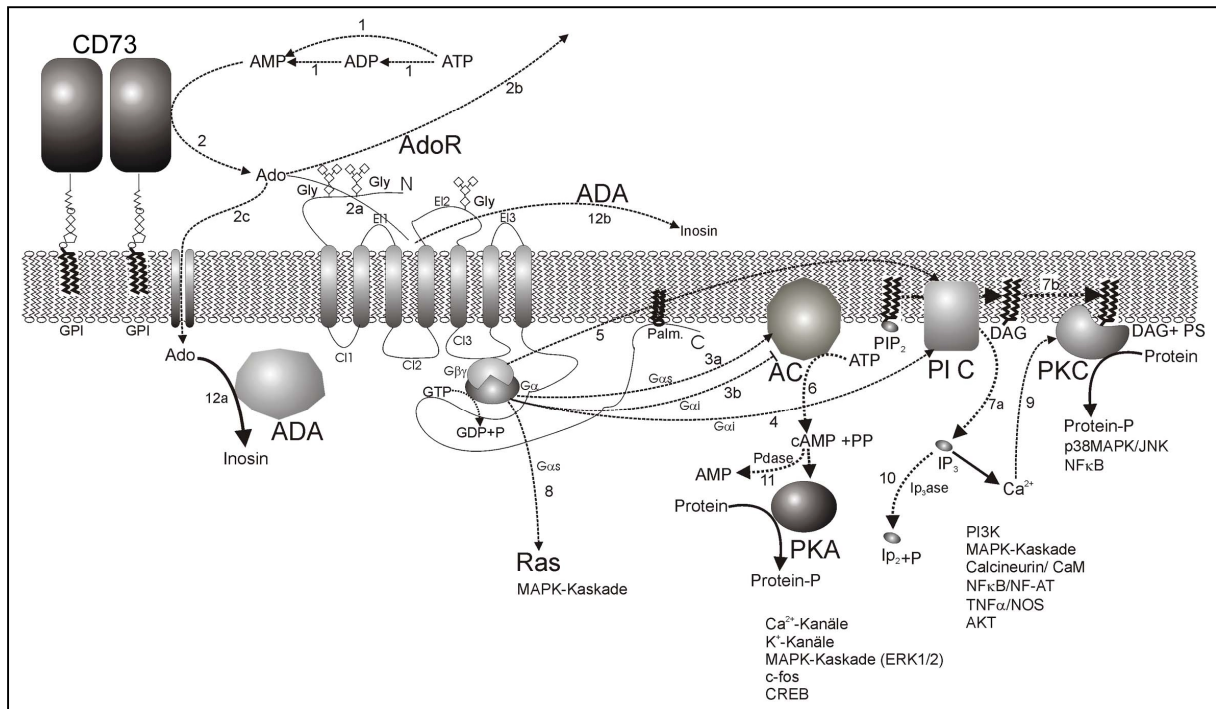


Abb. 2: Übersicht über den Adenosin-vermittelten Signaltransduktionsweg.

Extrazelluläre Nukleotidphosphate können von Ecto-Enzymen (1; zusammengefaßt in (Zimmerman *et al.* 1996)) zu AMP abgebaut werden. Ecto-5'-Nukleotidase dephosphoryliert zu Adenosin (2; (Zimmermann 1992)), welches als Substrat der AdoR fungieren (2a) oder in parakriner Weise wirken kann (2b; (Narravula *et al.* 2000)). Alternativ kann Ado auch in die Zelle importiert werden (2c; (Barbieri *et al.* 1998)). Die Signalfortleitung erfolgt über die Familie der G-Protein-gekoppelten Adenosinrezeptoren, deren Kopplungspartner, Mitglieder der heterotrimeren G-Proteine, verschiedene Signalkaskaden aktivieren können (3-5;8). G-Protein α -Untereinheiten stimulieren die Aktivität der Adenylcyclase (AC) (3a; $G_{\alpha s}$ siehe auch (Seidel *et al.* 1999)) oder inhibieren sie (3b; $G_{\alpha i}$ (Munshi *et al.* 1991)), bzw. induzieren die Aktivität der Phospholipase C (PLC) über $G_{\alpha i}$ (4; (Abbraccio *et al.* 1995)) oder G_q (Feoktistov *et al.* 1999)). Stimulatorische α -Untereinheiten der G-Proteine sind auch in der Lage, Komponenten der MAPK-Kaskade, insbesondere Ras zu aktivieren (8; (Sextl *et al.* 1997)). Die regulatorischen $\beta\gamma$ -UE können ebenfalls aktivierend wirken (PLC; 5; (Hakonarson *et al.* 1998) und Ras (van Biesen *et al.* 1995)). Stimulation der AC führt zu einer Erhöhung des cAMP-Niveaus der Zelle und somit zur Aktivierung der Proteinkinase A (6). PKA reguliert unter anderem die Aktivität neuronaler Ca²⁺-Kanäle (Gubitz *et al.* 1996), K⁺-Kanäle (Mutafova-Yambolieva *et al.* 1997), die extrazellulär regulierten Kinasen ERK1/2 (Bornfeldt *et al.* 1999), den Transkriptionsfaktor c-fos (Kull *et al.* 1999) und aktiviert CREB-vermittelte Transkription (Andrisani 1999). Regulation der cAMP-Respons ist Aufgabe der Phosphodiesterase (Pdase), welche durch Xanthine wie Theophyllin inhibiert werden kann (11; (Coskey *et al.* 1993)).

Aktivierung der PLC (4,5) führt zur Spaltung des Phosphatidyl-Intositol-Diphosphates (PIP₂) zu Diacylglycerin (DAG) und Inositol 1,4,5-Triphosphat (IP₃), dem Mediator des „Inositol-Triphosphat-Signalweges“ (7a). IP₃ induziert einen Anstieg des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels und führt u.a. zur Aktivierung der Proteinkinase C (9; in Verbund mit DAG und Phosphatidyl-Serin (PS) (7b (Bell *et al.* 1986); (Hakonarson *et al.* 1998)). Weitere Effektoren des IP₃-Signalweges sind die PI₃-Kinasen (PI₃K) und die nachgeschaltete Proteinkinase B/AKT (Gao *et al.* 2001; Germack *et al.* 2000) sowie Mitglieder diverser MAPK-Kaskaden (Baines *et al.* 1999; (Feoktistov *et al.* 1999)). Erhöhte Ca²⁺-Spiegel aktivieren Calmodulin (CaM) (Soderling 1999) und regulieren über die Phosphatase Calcineurin den Transkriptionsfaktor, NF-AT (Hemenway *et al.* 1999). Weiterhin nimmt die IP₃-Signal-kaskade Einfluß auf die Aktivierung des antiinflammatorischen NF κ B (Li *et al.* 2000b) und ist beteiligt an der Expressionskontrolle der NO-Synthase (Zhao *et al.* 2000) und des Tumor-Nekrose-Faktors α (TNF α) (Sajjadi *et al.* 1996). Reguliert wird die Respons über Dephosphorylierung von IP₃ mittels IP₃ase (10; (Hughes *et al.* 1990)).

Adenosin wird rasch sowohl innerhalb des Cytoplasmas (12a) als auch an der Zelloberfläche (12b) von der Adenosin-Desaminase (ADA) abgebaut (Hershfield 1998) und somit dem Signalweg als Substrat entzogen.

Adenosin wirkt als Ligand der sogenannten Adenosin-Rezeptoren (P1; AdoR), einer Familie G-Protein gekoppelter 7-Transmembrandomänen-Rezeptoren (Olah *et al.* 1995), von denen bisher 4 Subtypen (A1, A2a, A2b, A3) bekannt sind (LeVine 1999).

2.1 Signalwege des Adenosins

Adenosin wird bei den unterschiedlichsten Ereignissen im Extrazellularraum gebildet. Hypoxische Bedingungen z.B. im Muskel können zu einer negativen ATP-Bilanz der Zellen führen, dem eine Erhöhung der intrazellulären Adenosin-Konzentration und ebenfalls ein Export von Adenosin gegenübersteht (Marshall 2000). Lyse von Zellen z.B. durch Verletzungen führt meistens zu einer Anreicherung der Zellumgebung mit Nukleotiden (Rudolphi *et al.* 1997), die über eine große Batterie von Ecto-Enzymen zu Adenosin abgebaut werden können (Zimmermann 1996).

Eine herausragende Rolle spielt dabei die Ecto-5'-Nukleotidase CD73, die AMP zu Adenosin abbaut (Resta *et al.* 1998). Je nach Gewebetyp kann nun dieses Adenosin in die Zelle importiert werden oder als Ligand der Ado-Rezeptoren in autokriner oder parakriner Weise fungieren (Narravula *et al.* 2000).

Stimulierung der A2a/A2bAdo-Rezeptoren führt zu einer Kopplung mit stimulierenden G-Proteinen ($G_{\alpha s}$), welche Adenylyl-Cyclase (AC) aktivieren und damit über den „second messenger“ Cyclo-3'-5'-AMP (cAMP) Proteinkinase A, wie auch die „mitogen activated Protein-Kinase“ (MAPK) Signalwege (Sexl *et al.* 1997), (Seidel *et al.* 1999), (Feoktistov *et al.* 1999) und „cAMP responsive Element Binding Protein“ (CREB) vermittelte Transkription aktivieren können (Andrisani 1999).

Die beiden regulatorischen Untereinheiten des stimulierenden G-Protein-Trimers ($G_{\beta\gamma}$) scheinen ebenfalls signalvermittelnd zu wirken (Ahmed *et al.* 1997). Oft findet man eine Aktivierung der Phospholipase C (PL C), die den sogenannten Inositol-Triphosphat-Signalweg aktiviert (Hakonarson *et al.* 1998). Dazu „downstream“ gelegene Effektoren wie Proteinkinase C oder der second Messenger Ca^{2+} zeichnen sich wiederum durch Aktivierung diverser Signalwege oder Effektoren (unter anderem Proteinkinase B/AKT (Germack *et al.* 2000), Calmodulin (CaM) (Soderling 1999), MAPK (Baines *et al.* 1999), NO-Synthase (Galea *et al.* 1999), (Zhao *et al.* 2000) und das antiinflammatorische NF κ B (Li *et al.* 2000b) aus.

Adenosin vermittelt hingegen bei den A1/A3 AdoR-Subtypen Signale über inhibierende G-Proteine ($G_{\alpha i}$), die die Adenylyl-Cyclase inhibieren und somit das cAMP-Niveau der Zelle erniedrigen (Munshi *et al.* 1991). $G_{\alpha i}$ wirkt hauptsächlich als Stimulator der Phospholipase C und erhöht hierdurch den Ca^{2+} -Spiegel der Zelle (Abbracchio *et al.* 1995), kann aber auch über seine $\beta\gamma$ -Untereinheit über p21ras die MAPK-Kaskade aktivieren (van Biesen *et al.* 1995).

Eine wichtige Rolle bei der Regulation der Adenosin-Respons kommt der membranorientierten Adenosin-Desaminase (ADA) zu, welche intra- wie extrazellulär Adenosin zu Inosin abbaut (Hershfield 1998).

2.2 Physiologische Rolle der Adenosin-Rezeptoren

AdoR	Vorkommen	Wirkung
A1AdoR	Gehirn	Ischämische Präkonditionierung (Abbraccio <i>et al.</i> 1999); Ca ²⁺ -Kanäle→Neurotransmission (Ambrosio <i>et al.</i> 1997); Ach- (Sperlagh <i>et al.</i> 2001), (Song <i>et al.</i> 2000), GABA- (Wu <i>et al.</i> 1995), Glu-Freisetzung (Abbraccio <i>et al.</i> 1999);
	Immunsystem	Neutrophile: Chemoattraktans; Adhäsion (Fredholm 1997); Plättchenaggregation (Seligmann <i>et al.</i> 1998); Mastzellen (Forsythe <i>et al.</i> 1999);
	Herz	Ischämische Präkonditionierung → K ⁺ -Kanäle (Yao <i>et al.</i> 1993);
	Blutgefäße	Vasodilator: K ⁺ -Kanäle/NO (Armstead 1997);
	Pankreas	Inh. der Insulin-Ausschüttung (Hillaire-Buys <i>et al.</i> 1994);
A2aAdoR	Gehirn	Antagonist der dopaminergen Signalfortleitung (Khisti <i>et al.</i> 2000); Stim. der Ach (Cunha <i>et al.</i> 1995)/GABA/Glu-Freisetzung (Cunha <i>et al.</i> 2000);
	Immunsystem	Neutrophile: Inh. der HO ₂ ⁻ -Freisetzung (Fredholm 1997); Monocyten: Inh. der TNF α -Freis. (Hasko <i>et al.</i> 2000); Stim. der IL10-Produktion (Zidek 1999); Stim. der Apoptosis in Thymozyten (Huang <i>et al.</i> 1997); Mastzellen: Inh. der Degranulation (Fenster <i>et al.</i> 2000);
	Pankreas	Stimulation der Glukagon-Freisetzung (Chapal <i>et al.</i> 1985);
A2bAdoR	Diffuse Verteilung	Cl ⁻ -Freisetzung im Darm (Strohmeier <i>et al.</i> 1997); Apoptosis (Peyot <i>et al.</i> 2000) und Wachstumsregulation in diversen Zelltypen (Dubey <i>et al.</i> 1998); (Xaus <i>et al.</i> 1999); IL8-Freisetzung (Feoktistov <i>et al.</i> 1995); Mastzellen: Stim. der Degranulation (Auchampach <i>et al.</i> 1997);
A3AdoR	Gehirn/ Herz	Ischämische Präkonditionierung (Carr <i>et al.</i> 1997); Apoptosis (Abbraccio <i>et al.</i> 1999);
	Immunsystem	Mastzellen: Stim. der Degranulation (Hannon <i>et al.</i> 1995); Makrophagen: Inh. der NO- und TNF α -Freisetzung (Sajjadi <i>et al.</i> 1996); Neutrophile: Inh. der Degranulation (Bouma <i>et al.</i> 1997); Regulation des Zellzyklus (Brambilla <i>et al.</i> 2000); (Fishman <i>et al.</i> 2000).

Tab. 1: Verteilung und Funktion der AdoR in den verschiedenen Geweben.

Adenosin-Rezeptoren findet man in so gut wie jedem Zelltypus wieder, jedoch sind die Verteilungen von Zelltyp zu Zelltyp verschieden und mit zum Teil unterschiedlicher subtypspezifischer Aufgabenverteilung.

Den A1AdoR findet man hauptsächlich im Gehirn, Immunsystem, Herz und den Blutgefäßen bei der Regulation der unterschiedlichsten Mechanismen, wie zum Beispiel der ischämischen Präkonditionierung im Gehirn oder der cardioprotektiven Wirkung von Adenosin bei z.B. Herzinfarkten wieder. Der A1AdoR ist außerdem in vielerlei Hinsicht in die Regulation der Neurotransmission involviert. Auch die Wirkung von Adenosin als Vasodilator ist auf die Regulation von K⁺-Kanälen und der damit verbundenen NO-Freisetzung durch den A1AdoR zurückzuführen (Li *et al.*

2000a); (Marshall 2000). Im Immunsystem wirkt Adenosin über den A1AdoR auf vielerlei Weise hauptsächlich entzündungsfördernd (Di Virgilio *et al.* 1996).

A2aAdoR findet man hauptsächlich im Gehirn als wichtigen Modulator der Neuro-
nenaktivitäten dopaminerger (siehe auch (Khisti *et al.* 2000)), cholinерger (Sperlagh
et al. 2001), GABAerger Signalwege (Cunha *et al.* 2000), wie auch anderer
Neurorezeptoren (Ribeiro *et al.* 1999).

Auch ist die anregende Wirkung von Koffein oder Theophyllin auf die Inhibition des
A2aAdoR-vermittelten Antagonismus der Signalfortleitung in dopaminergen Neuro-
nen zurückzuführen (Fredholm 1995).

Im Immunsystem entfaltet der A2aAdo-Rezeptor in vielschichtiger Weise entzün-
dungshemmende Wirkungen (Cronstein 1994), wirkt im allgemeinen eher immu-
n-suppressiv (Spychala 2000) und ist maßgeblich an der Adenosin-vermittelten Apop-
tosis der CD4⁺/CD8⁺-Subpopulation im Thymus beteiligt (Apasov *et al.* 2000).

Stimulierung des A2aAdoR-Rezeptors im Pankreas führt zur erhöhten Ausschüttung
des Glukagons und untermalt damit die Rolle der AdoR in der Regulation des Gluko-
sehaushaltes (Chapal *et al.* 1985).

Der A2bAdoR ist von allen Subtypen der am weitesten verbreitete. Praktisch in
jedem Zelltyp findet man im allgemeinen niedrige Expressionsniveaus dieses Sub-
typs (Pierce *et al.* 1992). A2bAdoR sind beteiligt an der Regulation der Chlorid-
Kanäle im Darm (Strohmeier *et al.* 1997), wie auch der Aktivität des „cystic fibrosis
conductance Regulators“ (CFTR) (Clancy *et al.* 1999).

A2bAdoR induzieren in verschiedenen Zelltypen Apoptosis (Peyot *et al.* 2000) und
haben oftmals eine wachstumshemmende Wirkung (Dubey *et al.* 1998), (Xaus *et al.*
1999). Innerhalb des Immunsystems aktivieren sie die Degranulation der Mastzellen
und sind damit auch verantwortlich für die bronchokonstriktive Wirkung des
Adenosins in Asthma (Pauwels *et al.* 1995), (Forsythe *et al.* 1999).

Adenosin-Rezeptoren des A3-Subtyps findet man hauptsächlich im Gehirn, dem
Herzen und diversen Zelltypen des Immunsystems. Im Gehirn spielt der A3AdoR
neben seiner neuroprotektiven Rolle bei ischämischen Ereignissen noch eine Rolle
bei der Regeneration oder aber der Apoptosis neuronalen Gewebes (von Lubitz *et al.*
1999). Eine ähnliche Rolle nimmt der A3AdoR auch im Herzen wahr (Vinten-
Johansen *et al.* 1999). Der A3-Subtyp inhibiert die Degranulation der Mastzellen und
ist somit querverschaltet mit dem Signalweg des A2aAdoR in diesem Zelltyp (Fenster
et al. 2000). Im allgemeinen wirkt der A3AdoR im Immunsystem entzündungshem-
mend (Di Virgilio *et al.* 1996). In diversen Zelltypen führt die Aktivierung des A3AdoR
zur Verlangsamung des Zellzyklus (Fishman *et al.* 2000), zu Veränderungen des
Cytoskeletts (Abbraccio *et al.* 1997) und induziert Apoptosis in verschiedenen
Gewebe (von Lubitz *et al.* 1999) und lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) (Kohn *et al.*
1996).

2.3 Molekulare Charakterisierung der Adenosin-Rezeptoren

Wie bereits erwähnt gehören die Adenosinrezeptoren zur Familie der G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren, deren charakteristisches Merkmal 7 membrandurchspannende α -Helices, homolog zum Bakterio-Rhodopsin, darstellen (LeVine 1999).

	MG	AS	Glykosyl.	Chros. Lokalisierung	Palmityliert	Phosphorylierungsstellen
AdoRA1 ($G_{i\alpha}$)	32 kD	326	1x N-Term. /EL2	1q31-32.1 (Deckert <i>et al.</i> 1995)	C-term. Cys (Linden 1994)	PKC/GRK (Dixon <i>et al.</i> 1997) [■] ; (Nie <i>et al.</i> 1997)
AdoRA2a (G_s/G_{olf})	45 kD	412	2x N-Term.	22q12-13 (Deckert <i>et al.</i> 1997)	-	PKC /GRK2,3,5 (Palmer <i>et al.</i> 1999)*
AdoRA2b (G_s/G_q)	36.4 kD	332	2x EL2	17p11.2-12 (Pierce <i>et al.</i> 1992)	C-term. Cys (Linden 1994)	GRK2 (Mundell <i>et al.</i> 1998)*
AdoRA3 ($G_{i\alpha}$)	36.6 kD	318	2x N-Term. /EL2	1p13.1-21.1 (Atkinson <i>et al.</i> 1997)	C-term. Cys (Linden 1994)	PKC/GRK2 (Ferguson <i>et al.</i> 2000)/ [■]

Tab. 2: Molekulare Charakterisierung der Adenosin-Rezeptoren. [■] =(Dixon *et al.* 1997); * =(Mundell *et al.* 1998).

Die codierenden Gene finden sich auf den Chromosomen 1 (q31-32.1 für A1AdoR bzw. p13.1-21.1 für A3AdoR), Chros. 22 (q12-13 für A2aAdoR) und Chros. 17 (p11.2-12 für A2bAdoR) und codieren Rezeptoren von 318 bis 412 As. Länge mit einem Gewicht von 32 bis 45 kD (Kilo Dalton). Alle 4 Subtyp-Gene besitzen ein Intron, welches den codierenden Bereich für den intrazellulären Loop 2 (CL2) unterbricht (Atkinson *et al.* 1997), und im Falle des A1AdoR zusätzliche Exons im 5'-UT Bereich, die vermutlich zu alternativen Splicing-Produkten führen können (Olah *et al.* 1995). Die größten Homologien in der Gensequenz zeigen die excitatorischen Rezeptoren des A2-Subtyps (60.9% des A2aAdoR zum A2bAdoR) und etwas geringere Homologien (49.5%) die inhibitorischen A1AdoR und A3AdoR (Linden 1994).

Allen Promotorbereichen fehlen die klassischen CAAT bzw. TATA-Boxen, an deren Stelle man eine „CAAT-like“ Box findet. Diverse Bindungsstellen bekannter Transkriptionsfaktoren, wie AP1, SP1, EF-1A oder NF κ B (Nie *et al.* 1998), sowie mehrere CREB-Bindungssequenzen konnten in den Promotoren identifiziert werden (Ren *et al.* 1994); (Atkinson *et al.* 1997).

2.3.1 Proteinstruktur der AdoR

Die Anordnung der Strukturelemente entspricht folgendem Schema:

Einem extrazellulär gelegenen N-Terminus folgen die bereits erwähnten 7 α -Helices, die durch jeweils 3 extrazelluläre (EL 1-3) wie 3 intrazelluläre (CL1-3) Loops verbunden sind, sowie einem cytoplasmatischen C-Terminus.

Die Bindung des Agonisten erfolgt in einer durch die ringförmige Anordnung der 7 α -Helices gebildeten Bindungstasche, an denen hauptsächlich der N-Terminus, die α -

Helices 5 bis 7 sowie 2 konservierte Histidine in Helix 6 und 7 beteiligt sind (His 250 bzw. His 278 in A2aAdoR) (Tucker *et al.* 1994).

Die Bindungsaffinität des nicht spezifischen AdoR-Agonisten N-Ethyl-Carboxamido-Adenosin (NECA) ermöglichte die Unterteilung in hochaffine Subtypen

(A1AdoR: $EC_{50} = 0.5 \mu M$; A2aAdoR $EC_{50} = 0.5 \mu M$) und im Vergleich dazu niedrig affine Subtypen (A2bAdoR: $EC_{50} = 20-50 \mu M$; A3AdoR: $EC_{50} = 1-2 \mu M$).

Für die Kopplung des Rezeptors mit den G-Protein-Untereinheiten sind 2 Motive innerhalb der α -Helix 2 (SLAXAD Ser-Leu-Ala-X-Ala-Asp) bzw. des cytoplasmatischen Loops 3 (DRY Asp-Arg-Tyr) (Olah *et al.* 1997), sowie Teile des C-Terminus verantwortlich (BXBXXB-Motiv) (Palmer *et al.* 1995); (Probst *et al.* 1992); (Olah *et al.* 2000).

Mit Ausnahme des A2aAdoR besitzen alle Subtypen eine Palmitoylierungs-Stelle im C-Terminus (Linden 1994). Mehrere N-Glykosylierungsstellen im N-Terminus, wie auch im 2. extrazellulären Loop konnten in den diversen Subtypen nachgewiesen werden (Linden 1994), (Deckert *et al.* 1995), (Deckert *et al.* 1997), (Pierce *et al.* 1992).

Mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase C und G-Proteingekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) sind in verschiedenen Subtypen bekannt (siehe Tab. 2).

2.4 Regulation der AdoR-Aktivität

Aufgrund der mannigfaltigen und sehr empfindlichen Verschaltung des Ado-Signalweges mit teilweise konkurrierenden AdoR-Subtypen in verschiedenen Signalwegen und Regulationsmechanismen ist eine genaue Regulation der AdoR-Respons von Nöten.

Diverse Regulationsmechanismen für verschiedene AdoR-Subtypen sind bekannt (Grady *et al.* 1997).

- Regulation der Aktivität Adenosin-verarbeitender Enzyme
- Regulation der Transkription der AdoR-Gene
- Posttranslationale Regulation
- Desensibilisierung und Internalisierung

2.4.1 Regulation der Aktivität Adenosin-verarbeitender Enzyme

An erster Stelle ist hierfür wohl die CD73 Ecto-5'-Nukleotidase zu nennen, deren Expression hauptsächlich transkriptionell reguliert wird (siehe auch 2.6). Einen schnellen Abbau des Adenosins ermöglicht die Adenosin-Desaminase, die Adenosin zu Inosin abbaut (Hershfield 1998). Weiterhin spielt sie bei der Desensibilisierung und Internalisierung des A1AdoR-Subtyps eine Rolle (Saura *et al.* 1998). Die wichtige Rolle der ADA findet man bei diversen genetisch bedingten Krankheiten (SCID), wo eine fehlende ADA-Aktivität ursächlich eine schwere Immundefizienz hervorruft. Verursacht wird dies u.a. durch A2AdoR-vermittelte Apoptosis der Lymphozyten-Vorläufer im Thymus (Huang *et al.* 1997).

2.4.2. Regulation der Transkription der AdoR-Gene

Excitatorische AdoR-Subtypen des A2-Types werden hauptsächlich transkriptionell reguliert (Peterfreund *et al.* 1997). Viele der relevanten Transkriptionsfaktoren werden mehr oder weniger direkt vom cAMP-Niveau der Zelle reguliert (Andrisani

1999), und ermöglichen hierdurch Feedback-Schleifen in der Rezeptor-Expressions-Regulation. Hierzu kommt noch die Möglichkeit der antagonistischen Kreuzregulation der AdoR-Subtyp-Transkription untereinander (siehe auch (Ren *et al.* 1994), (Atkinson *et al.* 1997)), wie unter anderem im Falle der A1AdoR und A2aAdoR-Subtypen dopaminergischer Neuronen bekannt ist (Ribeiro *et al.* 1996).

2.4.3 Posttranslationale Regulation

Sowohl die N-Glykosylierung des N-Terminus, wie auch die Palmitylierung des C-Terminus ermöglichen auf dieser Ebene eine Regulation der Proteinreifung, wobei letzteres hauptsächlich eine Stabilisierung z.B. des A1AdoR gegen vorzeitige Degradierung bewirkt (Gao *et al.* 1999).

2.4.4 Desensibilisierung und Internalisierung

Inhibitorische AdoR werden hauptsächlich in ihrer Aktivität über kombinierte Desensibilisierung mittels phosphorylierender Kinasen (PKC oder GRKs) (Dixon *et al.* 1997), (Palmer *et al.* 1999), (Mundell *et al.* 1998), (Ferguson *et al.* 2000) und anschließende Internalisierung und Degradierung oder Lagerung reguliert (Palmer *et al.* 1995). Im Falle des A1AdoR-Subtyps herrscht die ADA-vermittelte Internalisierung als Regulationsmechanismus vor (Saura *et al.* 1998), während die A3AdoR-Aktivitätsregulation hauptsächlich von Kinasen bestimmt wird (Ferguson *et al.* 2000). Auch im Falle der excitatorischen AdoR findet man eine GRK-bedingte Desensibilisierung des Rezeptors (Mundell *et al.* 1998), sowie die Modulation der nachgeschalteten Adenylylcyclase-Aktivität (Chern *et al.* 1995).

2.5 AdoR-Interaktionen

AdoR interagieren auf mannigfaltige Weise mit den verschiedensten Rezeptoren und Proteinen. So findet man die oben erwähnte enge physische Interaktion der ADA mit dem A1AdoR, aber auch Hitzeschockproteine, wie HSC73 können mit AdoR koppeln (Sarrío *et al.* 2000). Verschiedene Subtypen koppeln und regulieren Rezeptoren der α - und β -adrenergen Subfamilie (Hoque *et al.* 2000) (Port *et al.* 1992), modulieren die Affinität D1- (Gines *et al.* 2000) bzw. D2-Dopaminergischer Rezeptoren (A2aAdoR) (Kull *et al.* 1999), (Salim *et al.* 2000) oder koppeln mit TSH-Rezeptoren (Tomura *et al.* 1997).

Aufgrund der komplexen Interaktionen mit verschiedenen Signalwegen und der vielschichtigen Regulationsmechanismen konnte bis dato noch kein umfassendes Bild der Adenosinrezeptor-Interaktionen in den verschiedenen Gewebetypen gewonnen werden. Ziel dieser Arbeit war es deshalb auch, in Modellsystemen die bisher noch wenig untersuchte Regulation der AdoR-Subtypen untereinander auf dem Transkriptionsniveau zu untersuchen. Ebenso wurde in diesem Konzept auf etwaige Kreuzregulationen mit den für den Adenosin-Signalweg wichtigen Schlüsselenzymen CD 73 und ADA untersucht.

2.6 Charakterisierung der Ecto 5'-Nukleotidase (CD73)

	MG	AS	Glykosyl.	Chros. Lokalisierung	Anker	Spaltungsstellen
CD73	69 kD	574	4x N-Term	6q14-21	GPI	PLC (Zimmermann 1992)

Tab. 3: Charakterisierung der Ecto 5'-Nukleotidase (CD73).

Die CD73 nimmt wohl eine der wichtigsten Schlüsselstellungen in der Ado-Signalkette ein. Das codierende Gen konnte auf Chromosom 6 (q14-q-21) lokalisiert werden und codiert in der reifen Form ein 69 kD schweres Protein von 574 As Länge mit 4 in der N-terminalen Hälfte gelegenen Glykosylierungsstellen, welches über einen komplexen GPI-Anker in der Membran verankert ist (Resta *et al.* 1998). Mehrere Enzyme mit ähnlicher Substratspezifität finden sich im Cytoplasma (Zimmermann 1992). Die GC-reiche Promotor-Region des Gens enthält keine TATA-Box, jedoch eine CCAAT-Box 500 BP „upstream“ der Initiationsstelle und unter anderem Bindungsstellen für SP1, CREB und NF κ B, was eine Regulation der CD73 auf der Transkriptionsebene nahelegt (Hansen *et al.* 1995). Zusätzlich ist noch bekannt, daß Phospholipase C (PLC), CD73 von der Zelloberfläche abspalten kann (Zimmermann 1992).

CD73	Vorkommen	Wirkung
	B+T-Lymphozyten	Differenzierungsmarker (Resta <i>et al.</i> 1998); T-Zell-Aktivierung (Gutensohn <i>et al.</i> 1995); Purin-Salvage (Thompson 1985); Ado-Produktion (Zimmermann 1992);
	Endothelium	Zelladhäsion (Airas <i>et al.</i> 1995);
	Darmepithel	Parakrine Regulation der Cl ⁻ -Sekretion (Strohmeier <i>et al.</i> 1997);
	Gehirn	Zelldifferenzierung (Heilbronn <i>et al.</i> 1995).

Tab. 4: Funktion und Vorkommen der CD73.

Man unterscheidet 4 große Aufgabenbereiche der CD73.

Ihre wohl wichtigste Aufgabe erfüllt sie als α_2 -Homodimer aktive AMP-Phosphatase und damit als Substratlieferant des Adenosin-Signalweges (Zimmermann 1992). Die immunstärkende Wirkung des Zinks ist wohl auch auf eine verbesserte CD73-Aktivität zurückzuführen (Prasad 1998), (Beck *et al.* 1997). Generell stellt die CD73 einen Differenzierungsmarker in der Lymphozyten-Population dar. 75% der B-Lymphozyten, sowie 19% der CD3⁺ (T-Zellrezeptor/TCR) 11% der CD4⁺ (T-Zellantigen) und 51% der cytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten exprimieren CD73. In diesen Populationen ist die CD73 auch bei der Wiederaufbereitung von Purinen tätig (Resta *et al.* 1998). In T-Lymphozyten spielt die CD73 auch eine accessorische Rolle bei der Aktivierung dieser Zellen, die unabhängig von ihrer Enzymaktivität erfolgt (Gutensohn *et al.* 1995), deren physiologische Relevanz jedoch unklar ist.

Als Oberflächenprotein scheint die CD73 auch bei der Zelladhäsion endothelen Gewebes eine Rolle zu spielen (Airas *et al.* 1995). Generell findet man in fast jedem Gewebe CD73-Phosphatase-Aktivität, wobei neben autokrinen Verschaltungen mit dem Adenosin-Signalapparat auch parakrine Wechselwirkungen z.B. mit der adeno-

sinvermittelten Aktivierung der darmepithelialen Cl^- -Kanäle bekannt sind (Strohmeier *et al.* 1997).

Inwiefern in diesem Zusammenhang die Expression von CD73 und diversen AdoR koordiniert wird, wurde bisher nicht eingehend untersucht. Dies gehörte auch deshalb zur Aufgabenstellung dieser Arbeit.

2.7 AdoR-Signaltransduktion in der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL)

Wie bereits erwähnt sind Adenosin-Rezeptoren maßgeblich an der Regulation des Zellwachstums und der Apoptose beteiligt. Darüber hinaus scheint Adenosin generell immunsuppressive Wirkungen zu besitzen, die beim Tumorwachstum eine Rolle spielen können (Sitkovsky 1998). Abweichende CD73-Expression fand man auch z.B. im Brustkrebs (Kruger *et al.* 1991), wie auch bei Darmkrebs (Navarro *et al.* 1998). Im Falle diverser Leukämien ist schon länger eine verminderte CD73-Expression bekannt (Gutensohn *et al.* 1990), was auch auf einen veränderten Adenosin-Signalweg zurückschließen lassen kann. Dazu gehört auch die sogenannte chronisch lymphatische Leukämie (CLL), die im Rahmen einer klinischen Studie in unserem Labor auf CD73-Aktivität untersucht wurde. Eine mögliche Koregulation der Expression diverser AdoR-Subtypen sollte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe einer zu etablierenden semiquantitativen RT-PCR untersucht werden.

Die CLL gehört mit zu den häufigsten Leukämie-Erkrankungen in der westlichen Welt mit einem durchschnittlichen Einstiegsalter von 50 bis 60 Jahren (Meinhardt *et al.* 1999). Ihr Verlauf ist von einer allmählichen Akkumulation nicht gereifter B-Lymphozyten geprägt, die, meistens in der G_1/G_0 -Phase ruhend, der Apoptose entkommen (Reed 1998). Behandlung der CLL erfolgt unter anderem mit Hilfe alkylierender Substanzen (Begleiter *et al.* 1996), Adenosin-Analoga oder indirekter AdoR-Antagonisten (Robertson *et al.* 1993), (Barbieri *et al.* 1998), wie 2-Chloro-Adenosin (2CA) oder Theophyllin (Vassallo *et al.* 1998), was auf eine Beteiligung der AdoR an den induzierten apoptotischen Reaktionen hindeutet.

2.7.1 Chromosomen-Anomalien der CLL

Chros. Modifikationen	Betroffene Gene
Del. 13q14	DBM (Brown <i>et al.</i> 1993);
Del.11q22.3-23.1	ATM,RDX (Stilgenbauer <i>et al.</i> 1996);
Del. 6q21-23	(Offit <i>et al.</i> 1993);
Del. 17p13	TP53 (Dohner <i>et al.</i> 1995);
Trisomie12	(Dohner <i>et al.</i> 1993);
T (14;19)(q32;q13)	BCL3→I κ B
	(Van Den Neste <i>et al.</i> 1996);
T(14;18)(q32;q21)	BCL2 (Adachi <i>et al.</i> 1990);
CGH: 8q24	c-myc (Bentz <i>et al.</i> 1995);
12p13	CyclinD2 (Werner <i>et al.</i> 1997);

Tab. 5: Übersicht über chromosomale Aberrationen und der darin involvierten Gene.

Die wichtigsten genetischen Reorganisationen in der CLL konnte mit Hilfe der Interphasen-Cytogenetik und der „Comparative Genome Hybridisation“ (CGH) gewonnen werden. Am häufigsten findet man Aberrationen der Chromosomenbereiche 13q, 11q, Trisomie 12, sowie gelegentlich strukturelle Aberrationen in den 6q bzw. 17p-Bereichen. Diverse balancierte Translokationen des IgH-Lokus (14q32) sind auch bekannt (Dohner *et al.* 1999).

Die daraus resultierenden Änderungen der Genexpressionen betreffen unter anderem Tumorsuppressorgene, wie TP53, „Disrupted in B-Cell malignancies“ DBM, „Ataxa telangiectasia mutated“ (ATM) und Radixin (RDX). Hinzu kommt noch Hochregulation der Expression des Proto-Onkogens c-myc sowie des an der Regulation des Zellzyklus beteiligten Cyclins D2. BCL2-Überexpression scheint hauptsächlich der Grund für die Apoptosis-Resistenz der CLL-Lymphozyten zu sein (Adachi *et al.* 1990). Hinzu kommt noch eine Hochregulation der NFκB-Aktivität, dessen Inhibitor IκB häufig disreguliert oder deletiert ist (Van Den Neste *et al.* 1996), (Meinhardt *et al.* 1999).

2.7.2 Signaltransduktionswege moduliert in der CLL

	Modulierte Proteine	Respons
Signaltransduktionswege		
Fas/CD95	Fas „downreguliert“;	Apoptosis inhibiert (Robertson <i>et al.</i> 1995);
TGFβ	TGFβR „downreguliert“;	Geringere Wachstumsinhibition (Lagneaux <i>et al.</i> 1997);
STAT	STAT1/3 konst. P;	(Frank <i>et al.</i> 1997);
BCR/CD5		Erhöhtes Ca ²⁺ -Signaling; Proliferation (Meinhardt <i>et al.</i> 1999);
PI ₃	CD45; PLC-γ ₁ ;	Defekte in PI ₃ -Signalwegen (Meinhardt <i>et al.</i> 1999); (Hivroz <i>et al.</i> 1990);
TNFα	NFκB (Jabbar <i>et al.</i> 1995);	Proliferation (Digel <i>et al.</i> 1989);
Transkriptionsfaktoren c-Jun		Inaktivierung, Deletion (Meinhardt <i>et al.</i> 1999);
c-fos		Überexpression (Schuh <i>et al.</i> 1996);
NFκB	IκB inaktiv (Van Den Neste <i>et al.</i> 1996);	Konst. Aktivierung (Schuh <i>et al.</i> 1996);
NF-ATp		Konst. Aktivierung (Schuh <i>et al.</i> 1996);

Apoptosis-Komponenten		
P53/MDM2		P53-Deletion, oder MDM2-Hochregulation (Johnston <i>et al.</i> 1997); (Watanabe <i>et al.</i> 1994);
BCL2	bcl2-Gen-Hypometh. (Hanada <i>et al.</i> 1993);	Inh. der cytc-vermittelten Apoptosis;
Zellzyklus		
CyclinD2	Überexpression	Erhöhte Überlebensrate (Delmer <i>et al.</i> 1995)

Tab. 6: Übersicht über die modulierten Signaltransduktionswege und -Komponenten in der CLL.

Wie bereits erwähnt zeigen CLL-Lymphozyten Charakteristika noch nicht ganz ausgereifter B-Lymphozyten ($CD5^+/CD19^+/CD23^+$), die sich durch niedrige Proliferationsrate und einem Zyklusarrest in der G_0/G_1 -Phase auszeichnen. Umfangreiche Untersuchungen der Signaltransduktionswege in der B-CLL zeigten viele Modulationen derselbigen.

Diverse apoptotische Signalkaskaden werden in der CLL abgeschaltet (Fas/CD95 oder P53), antiapoptotische hochreguliert (BCL2 und CyclinD2) oder wachstumshemmende desensibilisiert (TGF β). Ebenso findet man Modifikationen des Phosphatidylinositol-Signalweges auf der Ebene der Phospholipasen oder der Tyrosin-Phosphatasen (CD45 (Justement *et al.* 1991)). Der klassische B-Zell-Rezeptor-Signalweg zeigt unterschiedliche Modifikationen in B-CLL-Klonen. Meistens findet man eine Ca^{2+} -bedingte proliferative Respons auf IgM-Crosslinking, jedoch sind auch Deletionen von Rezeptorkomponenten (Thompson *et al.* 1997) und Modifikationen in den normalerweise nachgeschalteten Signalkaskaden, wie p21Ras oder den Protein-Tyrosin-Kinasen, bekannt, die sich hauptsächlich in einer besseren Prognose des Krankheitsverlaufes manifestieren (Meinhardt *et al.* 1999). Generell findet man eine konstitutive Aktivierung proliferativer Transkriptionsfaktoren, wie NF κ B, NF-ATp und unterschiedliche Modifikationen innerhalb der Komponenten des AP1-Transkriptionsfaktors (c-Jun-Deregulation, c-fos-Hochregulation). Dennoch besitzen CLL-Klone immer noch den kompletten apoptotischen Caspase-Apparat (Bellosillo *et al.* 1997), der jedoch durch Überexpression der antiapoptotischen Proteine der BCL-Familie, wie BCL2, suprimiert wird (Hanada *et al.* 1993). Eine in den letzten Jahren bekannt gewordene Induktion der Apoptosis durch Purin-vermittelte Signalwege in der CLL (Peng *et al.* 1998); (Keating 1999), führte unter anderem zur Entwicklung diverser Ado-Analoga (2CA) oder Modulatoren „downstream“ gelegener Komponenten, wie der Phosphodiesterase (Theophyllin (Mentz *et al.* 1999)). Inwiefern die diversen AdoR-Subtypen an der apoptotischen Antwort beteiligt sind, ist immer noch Gegenstand der Forschung.

Für diesen Zweck wurden im Rahmen der oben genannten klinischen Studie innerhalb dieser Arbeit die Transkriptionsniveaus der 4 AdoR-Subtypen bestimmt und auf eine eventuelle Brauchbarkeit als prognostischer Faktor hin untersucht.

2.7.3 Mitogene Signale und ihre Verschaltung mit dem AdoR-Signalweg

Mitogene Signale können auf verschiedene Weise in die Zelle weitergeleitet werden. In den meisten Fällen erfolgt über die diversen Signalkaskaden eine Freisetzung sekundärer Messenger, wie cAMP oder Ca^{2+} und eine Aktivierung der damit verbundenen Effektoren, und/oder die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren.

AdoR spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Fortleitung proliferativer, wachstumshemmender oder apoptotischer Signale und sind, je nach Zustand der Zelle, diversen Regulationsmechanismen unterworfen (siehe dazu auch 2.2; Tab. 1)

Mit Hilfe einer von B. Kempkes (GSF-Hämatologikum/München) zur Verfügung gestellten B-Lymphoblastoiden Zelllinie (493-6) konnten verschiedene proliferative Zustände durch selektive Aktivierung zweier mitogener Signale (c-myc und EBNA2) dargestellt werden, die daraufhin auf die Enzymaktivität der CD73, sowie der Transkriptionsniveaus der diversen AdoR-Subtypen hin untersucht wurden.

Der Transkriptionsfaktor c-myc stellt ein Proto-Onkogen dar, dessen konstitutive Aktivierung in z.B. Brustkrebs und Burkitt-Lymphomen, wie auch der CLL bekannt ist (Garte 1993). Normalerweise induziert die Aktivierung von c-myc die Differenzierung und Proliferation von Zellen und über seinen Effektor CyclinD1 den Fortschritt im Zellzyklus (Chiarugi *et al.* 1996), (Nasi *et al.* 2001).

Das Epstein-Barr Nukleäre Antigen 2 (EBNA2), reguliert die Aktivierung von RBP-J κ , einem dem NF κ B „upstream“ gelegenen Modulator und ist somit in die proliferative Signalkaskade des NF κ B eingegliedert (Sakai *et al.* 1997). Sein humanes Analogon ist der sogenannte Notch-Rezeptor (Strobl *et al.* 1997), der unter anderem eine Rolle bei der Zelldifferenzierung und Gewebereparatur im Gehirn spielt (Beatus *et al.* 1998).

Gegenstand dieser Arbeit war es nun, eine eventuelle Regulation der oben genannten Gene in Abhängigkeit der diversen proliferativen Zustände dieser Zelllinie zu untersuchen.

3 Aufgabenstellung

Adenosin ist maßgeblich beteiligt an der Regulation verschiedenster physiologischer Ereignisse, wie Apoptosis, Neuronaler Signalfortleitung, Glukosestoffwechsel, Immunrespons und Zellwachstum bzw. -Differenzierung.

Vermittelt werden diese Signale durch die Familie der G-Protein-gekoppelten Ado-Rezeptoren, deren 4 Subtypen ein -zum Teil komplexes- Netzwerk gegenseitiger Beeinflussungen aufbauen, die von Zelltyp zu Zelltyp verschieden sein können.

Interaktionen der AdoR untereinander, hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene, sollten anhand von Modellsystemen verschiedener eukaryontischer Zelllinien studiert werden. Hierfür sollten EGFP-Fusionskonstrukte der 4 AdoR-Subtypen etabliert werden und in CHO- und HeLa-Zelllinien transfiziert werden. Eventuelle Änderungen der Transkriptionsniveaus der verschiedenen Subtypen einer Transfektante sollten mit Hilfe einer zu etablierenden semiquantitativen RT-PCR untersucht werden. Ebenso sollte nach regulatorischen Effekten auf die mRNS-Niveaus der 4 Subtypen nach Stimulierung mit Ado-Agonisten in den verschiedenen Transfektanten und der lymphoblastoiden Zelllinie Raji gesucht werden.

Modulatorische Komponenten des Ado-Signalweges, wie z.B. CD73 oder ADA, sollten ebenfalls auf eine mögliche Interaktion mit den möglichen AdoR-internen Regulationsmechanismen untersucht werden. Da Adenosin gerade im Immunsystem oftmals differenzierungs- und proliferative Signale vermittelt und in diversen Lymphomen Modulationen der CD73-Aktivität bekannt sind, sollte in einem B-lymphoblastoiden Modellsystem, der 493-6 Zelllinie, die Auswirkung diverser proliferativer Zustände -modulierbar in diesem System durch 2 Mitogene, EBNA2 und c-myc- auf die Aktivität/Expression der verschiedenen Komponenten des Ado-Signalweges auch anhand der AdoR-stimulusabhängigen Erhöhung des cAMP-Niveaus untersucht werden.

Verminderte CD73-Aktivität ist auch in der chronisch lymphatischen Leukämie bekannt und auch AdoR zeigten physiologische -insbesondere apoptotische- Wirkungen in den entsprechenden B-Lymphozyten. Inwiefern AdoR als Marker eine Rolle bei dieser Krankheit spielen könnten, sollte in einer klinischen Studie mit 48 CLL-Patienten untersucht werden.

4 Material

4.1 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Agarose, ultra pure	Gibco-BRL, Paisley, GB
Ampicillin (Natriumsalz)	Sigma, Deisenhofen
Anti-Digoxigenin-AK, Fab Fragment	Boehringer, Mannheim
Bacto-Agar	Difco, USA
Bacto-Trypton	Gibco-BRL, Paisley, GB
Betain	Sigma, Deisenhofen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Sigma, Deisenhofen
CDP Star	Promega, Mannheim
DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid)	Sigma, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat („DEPC“)	Sigma, Deisenhofen
DIG-dUTP	Boehringer Mannheim
Dimethylsulfoxid („DMSO“)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Effectene Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
FCS	Biochrom KG, Berlin
Ficoll 400	Pharmacia, USA
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
Formamid deionisiert	Sigma, Deisenhofen
FuGENE 6	Boehringer, Mannheim
Geneticin (G-418 Sulfat)	Life Technologies, Eggenstein
Glycerin	Merck, Darmstadt
Hefe-Extrakt	Gibco-BRL, Paisley, GB
Hygromycin B	Calbiochem, Bad Soden
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
Laurylsulfat („SDS“)	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Boehringer, Mannheim
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Morpholino-Propansulfonsäure („MOPS“)	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Sigma, Deisenhofen
Penicillin-Streptomycin	Boehringer, Mannheim
Polyethylenglykol	Merck, Darmstadt
Polyethylenglykol 4000	Roth, Karlsruhe
Rinderserumalbumin („BSA“)	Life Technologies, Eggenstein
RPMI 1640	Biochrom KG, Berlin
β-Estradiol	Sigma, Deisenhofen
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, USA

Tetracyclin	Sigma, Deisenhofen
Titriplex III („EDTA“)	Merck, Darmstadt
Trishydroxymethylaminomethan („TRIS“)	Merck, Darmstadt
Tween-20	Sigma, Deisenhofen
Xylencyanol	Sigma, Deisenhofen

4.1.1 AdoR-Agonisten

NECA (5'-N-Ethyl-Carboxamido-Adenosin)	Sigma, Deisenhofen
R-PIA ((R)-N6-(1-Methyl-2-phenylethyl)adenosin)	Sigma, Deisenhofen
CGS21680 (2-p-(2-Carboxyethyl)phenethylamino-5'-N-ethylcarboxamido-adenosin))	Sigma, Deisenhofen)
Ro 20-1724 (4-[(3-Butoxy-4-methoxyphenyl)methyl] 2-imidazolidinon	Sigma, Deisenhofen

4.1.2 DNS-Längenstandard

123BP-Leiter	Gibco-BRL, Paisley, GB
--------------	------------------------

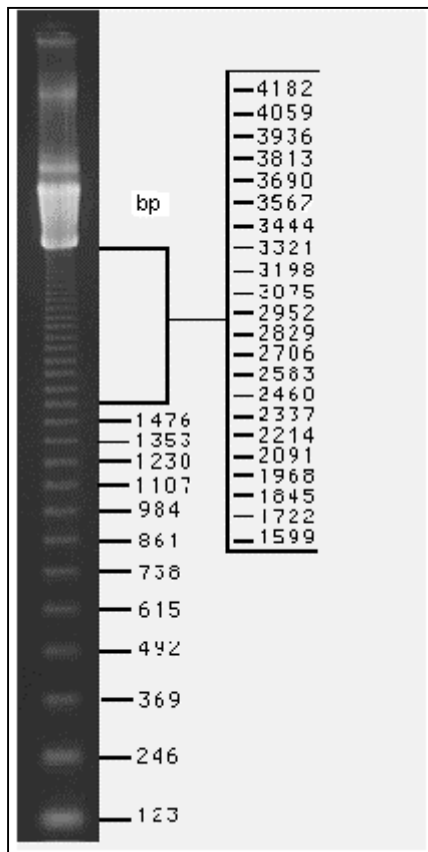


Abb. 3: 123 BP-DNS-Leiter in 1.5%igem Agarosegel

4.2 Geräte

J21B Zentrifuge	Beckman
Biofuge A Tischzentrifuge	Heraeus-Christ, München
Roto Silenta K Zentrifuge	Hettich
Brutschränke für Zellkultur	Heraeus, München
Inkubatorschrank (Bakterienkulturen)	Heraeus, München

Horizon 11-14 Gelkammern	Gibco BRL, Paisley, GB
PH-Meter pH526	WTW, München
Heizblock	Gebr. Liebisch GmbH, München
Thermostat K4R Elektronik	MgW Lauda, Lauda-Königshofen
SterilGARD Hood	Baker Comp., USA
PCR-Cycler PTC-200	MJ Research (Biozym), Oldendorf
Wasserbad	J. Kötterman KG, München
Genequant UV-Spektrometer 55646	Pharmacia, USA
CCD-Analysator Easy 429K	Herolab, Wiesloch
UV/VIS-Spektrometer 252	Gilford, USA
Lichtmikroskop (Zellkultur)	Leitz
Axiovert 135 TV Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Göttingen
Multiscan MC	Titertek

4.3 Reagenziensätze und Kits

dNTP-Set (je 100 µM)	Pharmacia, USA
PCR-Purification Kit	Boehringer, Mannheim
Gel-Extraktions-Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Midiprep Kit	Qiagen, Hilden
QiaAmp RNA-Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
ABI PRISM BigDye Ready Reaction Terminator	Applied Biosystems (Perkin Elmer), Weiterstadt
Cycle Sequencing Kit	Boehringer, Mannheim
Expand, High Fidelity PCR-Kit	Boehringer, Mannheim
High Pure PCR Product Purification Kit	Boehringer, Mannheim

4.4 Bakterien-Stämme

E. coli DH5α: Φ80dlacZΔM15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(rK-, mK+)

4.5 Zelllinien

CHOp42:	Chinese Hamster Ovary-Zelllinie
Jurkat:	lymphoblastoid-artige Leukämie-T-Lymphozytenlinie
Raji:	lymphoblastoid-artige Burkitt-Lymphom-B-Lymphozytenlinie
HeLa S2:	epitheliale Cervixcarcinom-Zelllinie
493-6:	Lymphoblastoide B-Zelllinie mit 2 induzierbaren Expressionssystemen für c-myc und EBNA2

4.6 Enzyme

T4-DNA-Ligase
 Vent (exo⁻) Polymerase
 AMV-Reverse Transkriptase
 Taq Polymerase

New England Biolabs, USA
 New England Biolabs, USA
 Promega, Mannheim
 Promega, Mannheim

4.6.1 Restriktionsendonukleasen

New England Biolabs, USA

	Restriktionsschnittstelle
Age I	A[^]CCGGT
Apa I	GGGCC[^]C
BamH I	G[^]GATCC
BstE II	G[^]GTNACC
Hind III	A[^]AGCTT
EcoR I	G[^]AATTC
EcoR V	GAT[^]ATC
Not I	GC[^]GGCCGC
Sac I	GAGCT[^]C
Sac II	CCGC[^]GG
Sma I	CCC[^]GGG

4.7 Oligonukleotide

Alle Primer wurden bei MWG, Ebersberg oder Metabion, Martinsried in Auftrag gegeben.

Die Primer wurden mit Hilfe des Geneworks-Programm entworfen und auf Primerdimerbildung oder interne Schlaufenbildung untersucht. Die Primer wurden mit dem Blast-Programm online auf Spezifität getestet.

Für die Berechnung der Schmelztemperatur wurde folgende Formel nach Newton und Graham (Newton *et al.* 1994) herangezogen:

$$T_m \approx (4x(G+C) + 2x(A+T))$$

4.7.1 Klonierungs-Primer

Für die Darstellung der EGFP-Fusionsproteine mussten Adaptersequenzen über PCR-Amplifikation eingefügt werden, die dann in pBS II SK (-) zwischenkloniert und sequenziert wurden.

4.7.1.1 Adapterprimer:

	Primername	Sequenz	Position im ORF
A1AdoR-Konstr.	GFPA1F1	TCCCCGCGGTACCTCCGGGTCAA GATCC	315
	GFPA1R1	ATAGTTTAGCGGCCGCATTATAC CGGTCCCCCGTCATCAGGCCTCT CTTCTG	977
A2aAdoR-Konstr.	GFPA2aF1	CTACATTGCCATCCGCATCC	305
	GFPA2aR1	ATAGTTTAGCGGCCGCATTCTTA TACCGGTCCCCCGGACACTCCTG CTCCATCC	1235
A2bAdoR-Konstr.	GFPA2bF1	CTCCGAGCTCGTGGGGATTTTGT CCCTGTGC	720
	GFPA2bR1	ATAGTTTAGCGGCCGCATTCTTA TACCGGTCCCCCTCCTAGGCCCA CACCGAGAGCAG	998
A3AdoR-Konstr.	GFPA3F1	TCCATCATGTCCTTGCTGGC	294
	GFPA3R1	ATAGTTTAGCGGCCGCATTCTTA TACCGGTCCCCCTCAGAATTCT TCTCAATGC	953

4.7.1.2 Sequenzierprimer (für pBS II SK (-)-Konstrukte):

Konstruktspez. Primer	Primername	Sequenz	Position im ORF
A1AdoR-Konstr.	GFPA1F1	s.o.	315
	A1R1	TCATCAGGCCTCTCTTCTGG	976
A2aAdoR-Konstr.	GFPA2aF1	s . o .	305
	A2aSeqF1	ATGCTGGGTGTCTATTTGC	576
A2bAdoR-Konstr.	A2bSeqF1	TGAGCTGATGGACCACTCG	647
A3AdoR-Konstr.	GFPA3F1	s.o.	294
	A3SeqF1	ATGGTATACTTCAGCTTCC	528
	A3R1	ACAAGCTGTGGTACCTCACC	787
Allgemeine Sequenzier-Primer			
	T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	„Upstream“ der pBSII-MCS
	T7	GTAATACGACTCACTATAGG GC	„Downstream“ der pBSII-MCS
	GFPR	CTTGTACAGCTCGTCCATGC	*C-Term. EGFP
	GFPSeqR	CCAGGATGGGCACCACC	*N-Term. EGFP

* Innerhalb der GFP-cDNS-Sequenz gelegen, wurden diese zum Sequenzieren der jeweiligen Ligationsstellen auf dem Gegenstrang verwendet.

4.7.2 RT-Primer

Für die reverse Transkription wurde der Not I-(dT)₁₈ Primer von Pharmacia benutzt:
AACTGGAAGAATTCGCGGCCGCAGGAAT₁₈

4.7.3 RT-PCR-Primer

Für die RT-PCR wurden folgende Primerpaare eingesetzt:

	Primernamen	Sequenz	Position im ORF
A1AdoR	A1MF	TTCTGCTTCATCGTGTCTGC	133
	A1MR	CTTCTTGTTGAGCTGCTTGC	641
A2aAdoR	A2aMF	TCCTCGGTGTACATCACG	16
	A2aMR	AAGAGACAGGCCACTTGGC	502
A2bAdoR	A2bMF	GACTTCTACGGCTGCCTCTTC	219
	A2bMR	GCAGCTTTCATTCGTGGTTC	497
A3AdoR	A3MF	GGCCAATGTTACCTACATCACC	28
	A3MR	GATGTCAAGATAGATGGCGC	599
c-myc	MycF	CTAGTGCTGCATGAGACAC	1289
	MycR	TGCTTGAATGGACAGGATGTAGGC	1803
ADA	ADAF	CTAGACGGATCCATCAAGCC	52
	ADAR	TCTTACACAGCTCCACCACC	511
PGK	PGKF	ATGATTATTGGTGGGAATGGCT	*
	PGKR	TCATCCATGAGAGCTTTGGTTCC	*
G3PDH	G3PDHF	TCCACCACCCTGTTGCTGTAG	+
	G3PDHR	GACCACAGTCCATGCCATCACT	+

* Mit freundlicher Genehmigung von Andreas Koch (Inst. für Klinische Chemie; Klinikum Innenstadt). Primer wurden aus einem Exon der Phosphoglyceratkinase gewählt und ergeben ein PCR-Produkt von 287 BP.

+ Primersequenz entnommen der Anleitung des Marathon Ready cDNA-Kits (Clontech).

4.7.4 Kompetitoren-Primer

Die für die semiquantitative RT-PCR notwendigen Kompetitoren wurden mit Hilfe folgender Primerpaare aus pBS II SK (-) gewonnen:

	Primername	Sequenz	Position im ORF
A1AdoR	A1CompF	TTCTGCTTCATCGTGTGCGCAA CAGCTATGACCATG	
	A1CompR	CTTCTTGTTGAGCTGCTTGCG TAAAACGACGGCCAGT	
A2aAdoR	A2aCompF	TCCTCGGTGTACATCACGAAC AGCTATGACCATG	
	A2aCompR	AAGAGACAGGCCACTTGGCGT AAAACGACGGCCAGT	
A2bAdoR	A2bCompF	GACTTCTACGGCTGCCTCTTC AACAGCTATGACCATG	
	A2bCompR	GCAGCTTTCATTTCGTGGTCCG TAAAACGACGGCCAGT	
A3AdoR	A3CompF	GGCCAATGTTACCTACATCAC CAACAGCTATGACCATG	
	A3CompR	GATGTCAAGATAGATGGCGCG TAAAACGACGGCCAGT	
pBSII-Homologe Sequenzen	CompF	AACAGCTATGACCATG	822
	CompR	GTAAAACGACGGCCAGT	600

4.7.5 Northern-Blot-Primer

Die Dig-markierten Blotsonden wurden mit folgenden Primern hergestellt:

	Primername	Sequenz	Position im ORF
A1AdoR	A1MF	s.o.	s.o.
	A1MR	s.o.	s.o.
A2aAdoR	A2aMF	s.o.	s.o.
	A2aMR	s.o.	s.o.
A2bAdoR	A2bMF	s.o.	s.o.
	A2bMR	s.o.	s.o.
A3AdoR	A3MF	s.o.	s.o.
	A3MR	s.o.	s.o.
CD73	CD73F	GACATTTCGGGTTTTGAAATG	705
	CD73R	CCAGATAGACAATTGTTTTCC	1088
ADA	ADAF	s.o.	s.o.
	ADAR	s.o.	s.o.

4.7.6 Zusätzliche Primer

	Primernamen	Sequenz	Position im ORF
A1AdoR	A1F1	CATCTCAGCTTTCCAGGCC	12
	A1R1	TCATCAGGCCTCTCTTCTGG	975
A2aAdoR	A2aR1	CCTTGAGCTCATGGCTAAGG	1173
A3AdoR	A3F1	GGCCAATGTTACCTACATCAC	29
	A3R1	ACAAGCTGTGGTACCTCACC	788
GFP	GFPF	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC	N-Term. EGFP

4.8 Vektoren

Folgende Plasmide kamen bei der Konstruktion der EGFP-Fusionsproteine der Adenosinrezeptoren (AdoR) zum Einsatz:

4.8.1 Fusionskonstrukt-Vektoren

Fusionskonstrukte der Adenosinrezeptoren mit EGFP („enhanced Green fluorescent Protein“) wurden in pEGFP-N1 (Clontech) etabliert (P_{CMV} ; Kan^R; Neo^R; Genbank-Nr.: U55762)

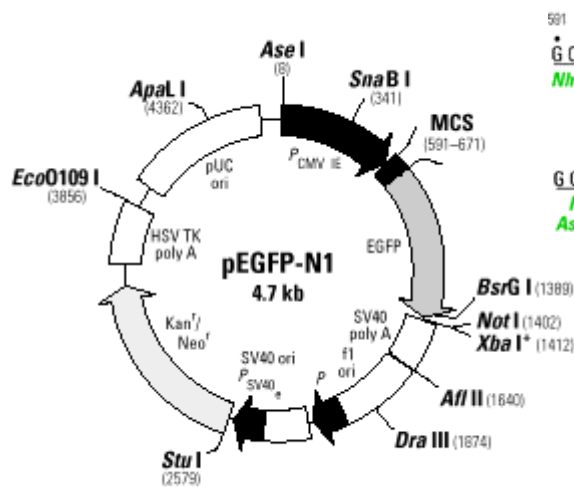


Abb. 4a: Schema des pEGFP-N1-Vektors

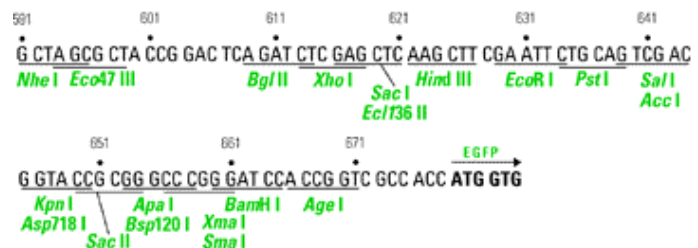


Abb. 4b: MCS des pEGFP-N1-Vektors

EGFP stellt ein für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Proteinexpression geeignetes Nachweissystem dar.

Ursprünglich entdeckt in der Quallenart *Aequorea victoria* zeigt dieses lösliche Protein aufgrund einer chromophoren Gruppe aus einem cyclisierten Tripeptid (Ser-Tyr-Gly in wt GFP bzw. Thr-Tyr-Gly (in EGFP) ein bei Bestrahlung mit blauem Licht angeregtes Emissionsmaximum bei 509 nm. Durch diverse Mutationen konnte eine leicht blauverschobene Variante des wt GFPs, das in dieser Arbeit verwendete EGFP, mit einem Emissionsmaximum bei 490 nm kreiert werden, das erhöhte Empfindlichkeiten bei der Anwendung üblicher fluoreszenzmikroskopischer Filtermethoden (FITC-Filter bei 488 nm) erzielte.

4.8.2 Klonierungs-Vektoren

Für die Zwischenklonierung der EGFP-Fusionskonstrukte wurden Teilsequenzen und PCR-Amplifikate in pBluescript II SK (-) (Stratagene) (Amp^R ; Genbank-Nr.: X52330) einkloniert und in Bedarfsfall sequenziert.

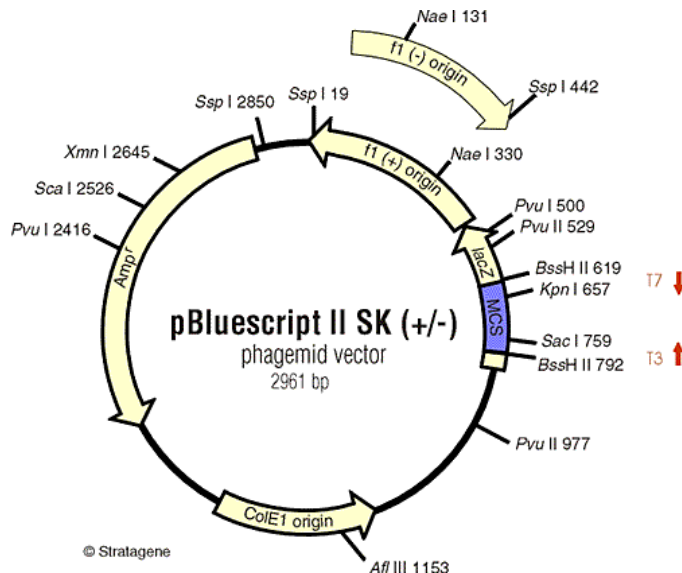


Abb. 5: Schema des pBS II SK (+/-)-Vektors

pRc/CMV (Invitrogen) (P_{CMV} ; Neo^R ; Amp^R ; ColE1 ORI) enthielt die originalen Adenosinrezeptorsequenzen.

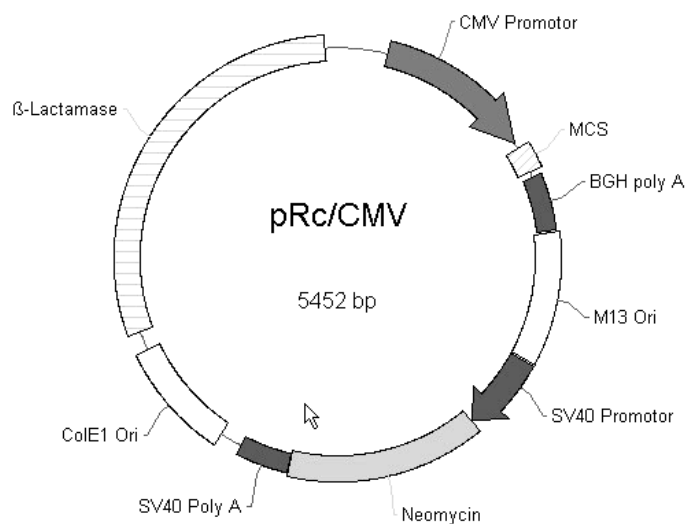


Abb. 6: Schema des pRC/CMV-Vektors

4.9 Etablierte Konstrukte

Folgende Konstrukte wurden im Verlauf dieser Arbeit synthetisiert bzw. verwendet:

A1AdoRpEGFP-N1: Fusionskonstrukt des A1-AdoR in pEGFP-N1
A2aAdoRpEGFP-N1: Fusionskonstrukt des A2a-AdoR in pEGFP-N1
A2bAdoRpEGFP-N1: Fusionskonstrukt des A2b-AdoR in pEGFP-N1
A3AdoRpEGFP-N1: Fusionskonstrukt des A3-AdoR in pEGFP-N1
pRc/CMV-A1AdoR: Originale A1-AdoR-cDNS-Sequenz in pRc/CMV
pRc/CMV-A2aAdoR: Originale A2a-AdoR-cDNS-Sequenz in pRc/CMV
pRc/CMV-A2bAdoR: Originale A2b-AdoR-cDNS-Sequenz in pRc/CMV
pRc/CMV-A3AdoR: Originale A3-AdoR-cDNS-Sequenz in pRc/CMV
pRc/CMV-A3AdoR-EGFP-8: A3-AdoR-EGFP-Fusionsgen in pRc/CMV 8. Klon
A2bpBSII-P1: GFPA2b-PCR-Produkt (NotI/SacI-Verdau) einkloniert in pBluescript II SK (-) 1. Klon
A2bpBS II-EGFP-P1-17: A2bpBSII-P1 mit einligierter EGFP-Sequenz (17.Klon)
A2apBS II-EGFP-P1-17: A2bpBSII-P1 mit einligierter (BstE2/Age I)A2aAdoR-Adaptersequenz
A3pBS II-EGFP-P1-17: A2bpBSII-P1 mit einligierter (BstE II/Age I) A3AdoR-Adaptersequenz
A1pBS II-EGFP-P1-17: A2bpBSII-P1 mit einligierter (BstE II/Age I) A1AdoR-Adaptersequenz

5 Methoden

5.1 Zellkultur

5.1.1 Allgemeine Anzuchtbedingungen

Alle Zelllinien wurden bei 37°C und 5% Kohlendioxid in einem Heraeus Inkubator-schrank in feuchter Atmosphäre inkubiert.

Für das Standardmedium wurde RPMI 1640 mit 10% FCS supplementiert, was 30 Minuten lang bei 56°C dekomplementiert wurde.

Für Selektionsmedien wurde von einer Geneticin-Stocklösung (50 mg/ml) in RPMI 1640 je nach Bedarf eine entsprechende Menge dem Standardmedium zugesetzt.

Zum Umsetzen von adhärenenten Zellen wurden die Zellen mit einer 0,02%igen (w/v) EDTA-Lösung in PBS 5 Minuten bei 37°C inkubiert und durch Klopfen abgelöst.

Für das induzierbare 493-6 Zellsystem wurde zur Selektion Hygromycin B zum Medium zugegeben und bei Bedarf mit β -Estradiol und/ oder Tetracyclin für die verschiedenen Induktionszustände versetzt.

Sämtliche Arbeiten wurden unter einer Sterilbank mit autoklavierten oder sterilfiltrierten Lösungen (0.2 μ m Porengröße) ausgeführt.

Zellkulturmedium:

RPMI 1640 supplementiert mit:

10 % FCS

1 mM Natriumpyruvat

2 mM L-Glutamin

100 U/ml Penicillin

100 μ g/ml Streptomycin

PBS (pH 7.2):

139 mM Natriumchlorid

2.7 mM Kaliumchlorid

8 mM Dinatriumhydrogenphosphat

1.5 mM Kaliumdihydrogenphosphat

in bidestilliertem H₂O

5.1.2 Transfektion

Stabile HeLa-Transfektanten wurden mit dem nichtliposomalen Effectene-Reagenz (Qiagen) erhalten.

Hierbei wird durch Einsatz eines „Enhancers“ die DNS vorab kondensiert, wodurch eine, im Vergleich zu handelsüblichen liposomalen Transfektionsreagentien, weitaus geringere Menge an DNS benötigt wurde.

5×10^4 Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in einer 24er-Platte ausgesät und ü.N. bei 37°C in Standardmedium kultiviert. Kurz vor der Transfektion wurde nach einmaligem Waschen mit PBS 350 µl frisches Medium pro Ansatz zugesetzt.

0.8 µg DNS wurde in 120 µl Kondensationspuffer EC verdünnt, mit 6.4 µl Enhancer gemixt und für 5 Minuten bei RT inkubiert.

Die Bildung des DNS-Lipidkomplexes erfolgte anschließend nach Zugabe von 8 µl Effectene-Reagenz bei RT für 10 Minuten.

Die Zellen wurden dann direkt mit dem Transfektionskomplex versetzt und 24h unter normalen Kulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurde mit Selektionsmedium auf stabile Transfektanten selektioniert.

Die Transfektion der CHOp42-Zelllinie erfolgte mit dem ebenfalls nichtliposomalen Eugene 6-Reagenz (Boehringer).

4×10^5 Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in 6er-Platten ausplattiert und ü.N. unter Normalbedingungen gezogen.

Pro Ansatz wurden je 3 µl Eugene-Reagenz 5 Minuten bei RT in 97 µl serumfreien OptiMem-Medium (Gibco) inkubiert. Nach Zugabe von 2 µg DNS in einem Volumen von 10 µl erfolgte die Komplexierung der DNS bei RT für 15 Minuten. Der Komplex wurde tropfenweise zu den Zellen in 1.5 ml frischem Standardmedium zugegeben und für 5h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach Austausch des Mediums nochmals 24h in Standardmedium gezogen, ehe eine Selektion der stabilen Transfektanten mit Selektionsmedium initiiert wurde.

5.1.3 Einfrieren und Auftauen

Zur Konservierung der stabilen Transfektanten wurden je ca. 1×10^7 Zellen für 10 Minuten bei 200 g; 4°C abzentrifugiert, in 500 µl Einfriermedium resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Zur längeren Lagerung wurden die Proben unter flüssigem N₂ aufbewahrt.

Aufzutauende Zellen wurden in einem 37°C warmen 70%igen Ethanolbad angetaut und sofort in 5 ml reinem RPMI 1640 resuspendiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 200 g; 4°C wurde das Zellsediment in 5 ml vorgewärmtem Selektionsmedium aufgenommen und kultiviert.

Einfriermedium:

60 % RPMI 1640 Medium

20 % FCS

20 % DMSO

5.1.4 Induktionsexperimente in der Zellkultur

5.1.4.1 HeLa, Raji, Jurkat

In diesen Zelllinien wurden Modelluntersuchungen des Adenosin-Signalweges über Stimulierung der AdoR mit verschiedenen Agonisten/Antagonisten durchgeführt.

Zur Stimulierung der excitatorischen A2-AdoR-Subtypen wurden 10 ml-Kulturen von ca. 50% konfluenten CHO- oder HeLa-Kulturen bzw. 20 ml-Kulturen der

Suspensionszelllinien (Raji, Jurkat) mit dem unspezifischen A2-AdoR-Agonisten NECA (50 nM Endkonz.; Sigma) in Gegenwart und Abwesenheit des Phosphodiesterase-Hemmers Ro 20-1724 (1:40 Verdünnung) (Sigma) für 24h inkubiert und anschließend die RNS isoliert.

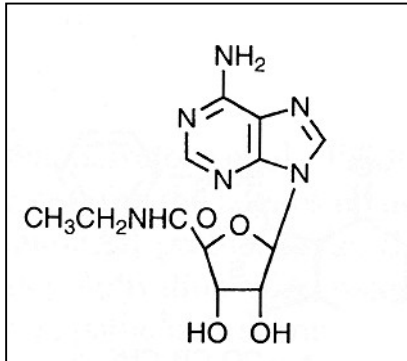


Abb.7: Strukturformel des A2-AdoR-Agonisten NECA

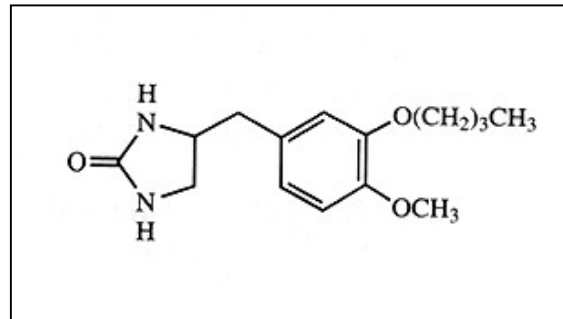


Abb. 8: Strukturformel des Phosphodiesterase-Hemmers Ro 20-1724

Die Untersuchung der inhibitorischen A1- bzw. A3-AdoR-Subtypen erfolgte unter gleichen Kulturbedingungen mit R-PIA (50 nM Endkonz.; Sigma).

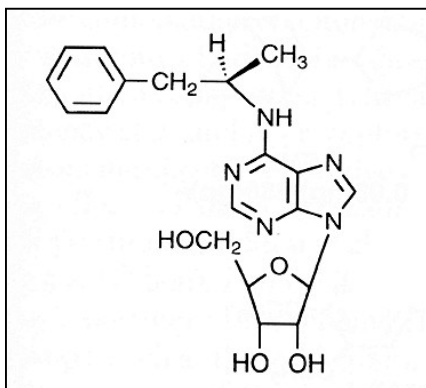


Abb. 9: Strukturformel des A1-/A3AdoR-Agonisten R-PIA

Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der A1AdoR-Internalisierung wurden A1AdoR-Transfektanten (CHO-A1AdoR-EGFP) auf Objektträgern angezo-gen und mit 50 nM R-PIA für 5 Minuten, 20 Minuten, 3h und 1 Tag inkubiert.

Die Zellen wurden jeweils nach Inkubationsende einmal mit PBS gewaschen und für 10 Minuten in 3.7%igem Formaldehyd fixiert.

Eine Anfärbung der Zellkerne erfolgte für 3 Minuten mit DAPI.

Die Auswertung der Fluoreszenzspektren erfolgte mit dem Axiovert 135 TV Fluoreszenzmikroskop bei 488 nm.

Ro-Stammlösung:

7 mg/ml Ro 20-1724 in EtOH

R-PIA-Stammlösung:

100 µM R-PIA in RPMI1640

NECA-Stammlösung:
100 μ M NECA in RPMI1640

DAPI-Stammlösung:
3% (w/v) DAPI in PBS

5.1.4.2 Das induzierbare Zellsystem 493-6

Diese, mit freundlicher Genehmigung von Dr. Bettina Kempkes (GSF; Hämatologikum) verwendete, lymphoblastoide Zelllinie enthält 2 unabhängig induzierbare Expressionssysteme für c-myc (Tet-off-System) und EBNA2 (Eppstein-Barr Nukleäres Antigen 2, induzierbar über einen β -Estradiolpromotor).

Das Tet-off-System stellt ein häufig verwendetes Expressionssystem dar, das eine Regulation der Genexpression mittels der Tetracyclin-Konzentration ermöglicht. Hierbei kommt ein Tetracyclin-kontrollierter Transaktivator (tTA) zum Einsatz, der in Abwesenheit von Tetracyclin an den phCMV-Promoter des Expressionsplasmides bindet und die Transkription des c-myc-Gens anschaltet.

Je nach Induktionszustand können nun 4 unterschiedliche Proliferationszustände simuliert werden, die von einer BL (Burkitt-Lymphom) über eine LCL (lymphoblastoide Zelllinie) bis zu einer nicht mehr proliferierenden Zelllinie reichen.

Auch hier wurde die Aktivität der excitatorischen A2-Ado-Rezeptoren mit dem unspezifischen Agonisten NECA, wie vorhergehend beschrieben, gemessen.

493-6 Standardmedium:
Standardmedium supplementiert mit 150 μ g/ml Hygromycin B.

493-6 Induktionsmedien:
493-6 Standardmedium supplementiert mit 1 μ M β -Estradiol und oder 1 μ g/ml Tetracyclin

Hygromycin B-Stammlösung:
30 mg/ml Hygromycin B in RPMI 1640

β -Estradiol-Stammlösung:
20 mM β -Estradiol in EtOH

Tetracyclin-Stammlösung:
1 mg/ml Tetracyclin in RPMI 1640

5.2 Bakterienkultur

DH5 α *E.coli*-Kulturen wurden in LB-Medium bei 37°C bei 200 upm inkubiert.

LB-Medium:

1.0 % (w/v) Bactotrypton

0.5 % (w/v) Hefeextrakt

1.0 % (w/v) NaCl

5.2.1 Darstellung kompetenter *E.coli*-Kulturen

500 µl einer 5 ml-ü.N.-Kultur wurden in 50 ml frisches LB-Medium überführt. Die Bakterien wurden bei einem OD₆₀₀ von 0.5 geerntet und nach 20 Minuten auf Eis bei 1200 g für 15 Minuten bei 4°C abzentrifugiert.

Das Sediment wurde sofort in 5 ml TSS-Lösung resuspendiert und die kompetenten Zellen innerhalb von 2 Tagen verwendet.

TSS-Lösung (pH 6.5):

85% (v/v) LB-Medium

10% (w/v) PEG 4000

5% (v/v) DMSO

50 mM MgCl₂

5.2.2 Transformation

Je 100 µl TSS-kompetenter Zellen wurden mit 10 ng bis 200 ng Plasmid-DNS für 20 Minuten auf Eis inkubiert und bei 42°C für 1 Minute transformiert. Die Ansätze wurden in 1 ml vorgewärmtem LB-Medium aufgenommen und für 30 Minuten bei 37°C geschüttelt.

Anschließend erfolgte die Ausplattierung auf entsprechenden selektionierenden LB-Agarplatten. Inkubiert wurde über Nacht bei 37°C.

Die Agarplatten wurden daraufhin für 3 Wochen bei +4°C gelagert.

LB-Amp-Platten (für pBSII und pRc/CMV):

1.5 % Bacto-Agar in LB-Medium autoklaviert. Supplementiert mit 100 µg/ml Ampicillin

LB-Kan-Platten (für pEGFP-N1):

1.5% Bacto-Agar in LB-Medium autoklaviert. Supplementiert mit 75 µg/ml Kanamycin

Die Klone wurden zur Weiterverarbeitung in 8 ml-ü.N.-Kulturen in selektierendem LB-Medium (100 µg/ml Amp oder 75 µg/ml Kan) aufgenommen und bei 37°C inkubiert.

5.2.3 Glycerinkulturen

Zur Aufbewahrung von transformierten *E.coli*-Kulturen wurden 800 µl der ü.N.-Kulturen mit 200 µl Glycerin versetzt und für 20 Minuten auf Eis gesetzt. Die Lagerung erfolgte anschließend bei -80°C.

5.3 Kompetitiver Immunoassay zur Messung der Adenosin 3', 5'-cyclo-Monophosphat-Konzentration

Cyclisches AMP stellt einen der wichtigsten „Second Messenger“ der Zelle dar und ist an der Regulation des allgemeinen Zellmetabolismus, des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und verschiedener Immunantworten beteiligt.

Als Mitglied der G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren sind auch die Adenosinrezeptoren an der Regulation der Adenylylcyclase beteiligt.

Deshalb wurden im Rahmen der Modelluntersuchungen der AdoR-Stimulierung an den lymphoblastoiden Zelllinien auch das jeweilige cAMP-Niveau der verschiedenen Induktionszustände untersucht.

Für diesen Zweck kam der „Correlate-EIA Direct Cyclic AMP Enzyme Immunoassay Kit“ der Firma Assay Designs Inc. zum Einsatz.

Es handelt sich hierbei um einen kompetitiven Immunoassay mit einem auf einer Mikrotiterplatte immobilisierten polyklonalen Anti-cAMP-Antikörper. Als Kompetitor für die in der Probe enthaltenen cAMP-Moleküle dient ein cAMP-Alkalische Phosphatase-Konjugat, dessen Enzymaktivität -bei 405 nm gemessen- invers proportional ist zu der in der Probe enthaltenen cAMP-Menge.

5.3.1 Vorbereitung der Zellen

Die Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen und in RPMI1640 auf 2×10^7 Zellen/ml eingestellt.

5.3.2 Inkubation der Zellen

Es wurden jeweils Doppelbestimmungen gemessen.

270 µl der eingestellten Zellen wurden für 15 Minuten bei 37°C mit 7.5 µl Phosphodiesterasehemmer Ro 20-1724 (7 mg/ml in EtOH) und mit 10 µM, 5 µM und ohne NECA oder dem A2aAdoR-selektiven Agonisten CGS21680 inkubiert. Der Überstand wurde nach 1-minütiger Zentrifugation bei 10000 upm abgenommen und das Sediment in 110 µl 0.1M HCl aufgelöst. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei 14000 upm wurden 100 µl des Überstandes in den Immunoassay eingesetzt.

5.3.3 Vorbereitung der Standardreihe

Aufgrund seiner kompetitiven Natur mußte zu jedem Assayansatz eine Standardverdünnungsreihe mitgeführt werden. Eine logarithmische Auswertung der Ergebnisse ergab dann eine Eichkurve, die für die Auswertung der Meßproben herangezogen wurde.

30 µl des Standards (2000 pmol/ml) wurden zunächst in 270 µl 0.1 M HCl aufgenommen und dann sukzessive im Verhältnis 1:4 verdünnt (S1-S5: 200, 50, 12.5, 3.12, 0.78 pmol/ml)

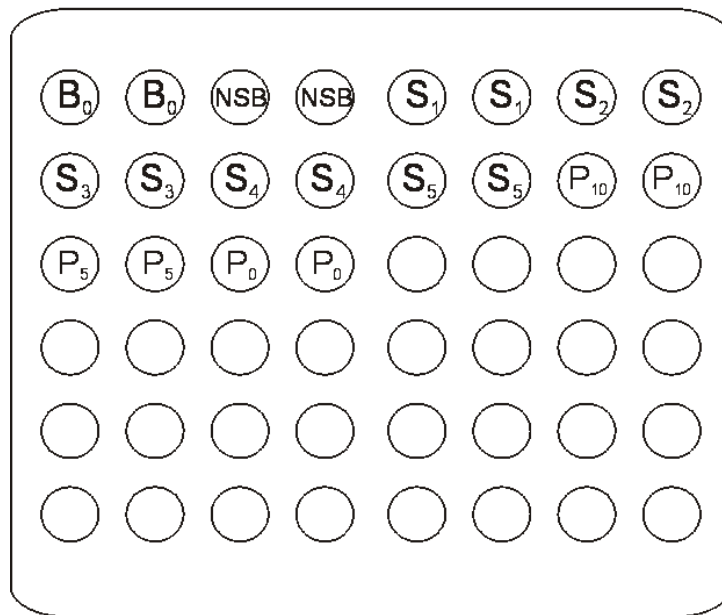


Abb. 10: Schema eines cAMP-Immunossays

B₀: Nullkontrolle mit Antikörper

NSB: Nullkontrolle ohne Antikörper

S₁-S₅: Verdünnungsreihe der cAMP-StandardsP₁₀: Inkubationsproben mit 10 μ M NECA inkubiertP₅: Inkubationsproben mit 5 μ M NECA inkubiertP₀: Uninkubierte Proben

5.3.4 Vorbereitung der Wellslots

	Neutral.- Reagenz	0.1M HCl	cAMP- Standard	Zelllysate	Konjugat- Lösung	Antikörper- Lösung
B ₀	50 μ l	100 μ l	-	-	50 μ l	50 μ l
NSB	50 μ l	150 μ l	-	-	50 μ l	-
Standard	50 μ l	-	100 μ l	-	50 μ l	50 μ l
Probe	50 μ l	-	-	100 μ l	50 μ l	50 μ l

Tab. 7: Pipetierschema des cAMP-Immunoassay

50 μ l des Neutralisierungs-Reagenz wurden in jeden Slot pipettiert. Je 100 μ l der Messproben und des Standards wurden in die entsprechenden Slots pipettiert und jeweils 100 μ l 0.1 M HCl zu den 4 Nullstandards (NSB/B₀) gegeben.

Nach Zugabe von 50 μ l 0.1 M HCL zum NSB Slot (Nullkontrolle ohne Antikörper) wurden in jeden Slot 50 μ l Konjugat-Lösung gegeben und sofort mit Ausnahme der NSB-Proben 50 μ l Antikörper-Lösung zupipettiert.

Der Immunoassay wurde anschließend für 2h bei RT mit 250 upm geschüttelt.

Nach 3-maligen Waschen mit je 200 μ l Wasch-Lösung wurden die Slots von allen Flüssigkeitsresten befreit und die Phosphatasereaktion durch Zugabe von 200 μ l p-Npp-Substratlösung für 1h bei RT durchgeführt.

Nach Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 50 μ l Stop-Lösung wurden sofort die Ergebnisse in einem ELISA-Leser ausgewertet.

5.3.5 Berechnung der Ergebnisse

Nach Berechnung des Mittelwerts der Optischen Dichte der jeweiligen Doppelbestimmungen wurde der jeweilige prozentuale Belegungsgrad der Slots mit dem cAMP-Phosphatase-Konjugat durch Abgleich mit der B_0 -OD errechnet.

$$\text{Belegung (\%)} = (\text{MW}(\text{Proben-OD}) / \text{MW}(\text{B}_0\text{-OD})) \times 100$$

Durch logarithmischen Auftrag der Belegung der Standardproben gegen die bekannte cAMP-Konzentration der Standardreihe erhielt man eine Eichkurve, die zur Auswertung der Meßproben verwendet wurde.

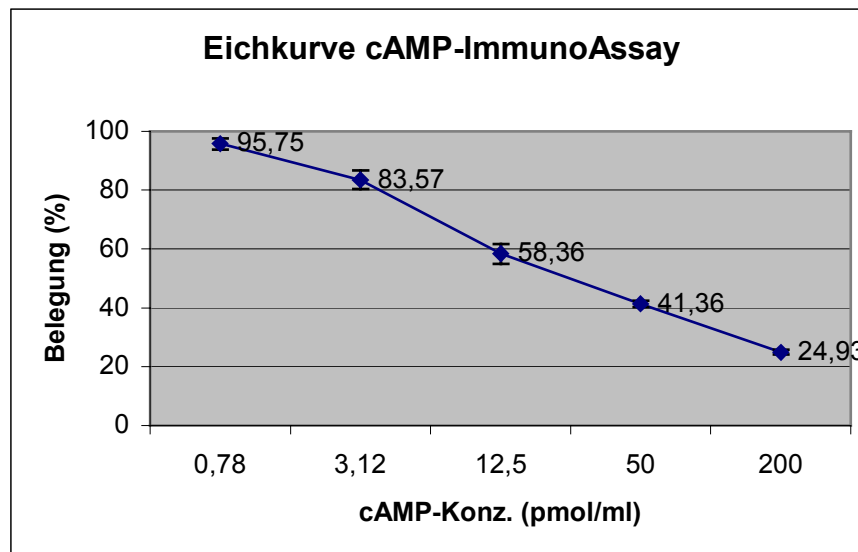


Abb. 11: Eichkurve des cAMP-Immunoassays.

5.4 Präparation von DNS

5.4.1 Plasmidisolierung

Prinzipiell beruht die Plasmidisolierung auf der Lyse der Bakterienkulturen in SDS-NaOH-Lösungen (pH 12-12.5), bei denen genomische DNS, RNA und Proteine nach erfolgter Neutralisierung mit Natriumacetat ausfallen. Anschließend erfolgt die Bindung der negativ geladenen Plasmid-DNS an einer Silikagel-Matrix, gefolgt von Waschschritten in ethanolhaltigen Puffern und Elution in Tris/HCl-Puffern (10 mM).

Bis zu 20 µg Plasmid-DNS erhielt man mit dem Qiaprep Spin Plasmid Miniprep Kit (Qiagen).

5-8 ml einer ü.N.-Kultur in selektierendem LB-Medium wurden für 30 Minuten auf Eis gestellt und anschließend für 15 Minuten bei 1200 g/4°C zentrifugiert.

Das Sediment wurde in 250 µl kaltem Puffer P1 resuspendiert und in 250 µl Lyse-puffer P2 aufgeschlossen. Nach 5 Minuten wurde die Lyse mit 350 µl kaltem Puffer P3 beendet und das Präzipitat 10 Minuten lang bei 13000 upm abzentrifugiert.

Der Überstand wurde auf die Spinsäulchen gegeben und für 45 Sek. Bei 14000 upm abzentrifugiert. Die Säule wurde 2 mal mit 750 µl Puffer PE per Zentrifugation gewaschen. Nach Entfernen der letzten Waschrückstände erfolgte die Elution mit 2 mal 45 µl 10 mM Tris/HCl (pH 8.5).

Für Plasmidisolierungen bis zu 100 µg wurde der Qiagen Plasmid Midi Kit verwendet.

30 µl einer ü.N.-Kultur in selektierendem LB-Medium wurden in 30 ml Selektions-LB-Medium für 12-16h bei 37°C 200 upm inkubiert.

Die *E.coli*-Kultur wurde für 15 Minuten bei 6000 g/4°C abzentrifugiert und das Sediment in 4 ml kaltem Puffer P1 resuspendiert.

Die Lyse erfolgte für 5 Minuten durch Zugabe von 4 ml Puffer P2 und anschließendem gelegentlichem Wenden der Probe bei RT.

Nach Neutralisation mit 4 ml kaltem Puffer P3 wurde noch für 15 Minuten unter gelegentlichem Wenden auf Eis inkubiert.

Das Präzipitat wurde bei 20000 g für 30 Minuten bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand abgenommen und erneut für 15 Minuten bei 20000g/4°C abzentrifugiert.

Der Überstand wurde auf -mit 4 ml Puffer QBT äquilibrierten- Fluß-Säulen gegeben.

Nach 2-maligem Waschen der Säulen mit je 10 ml Puffer QC wurde die DNS mit 5 ml Puffer QF eluiert.

Nach Zugabe von 3.5 ml Isopropanol wurde die Plasmid-DNS durch Zentrifugation bei 15000g/4°C für 30 Minuten gefällt.

Das Sediment wurde einmal mit 2 ml 70%igem EtOH gewaschen und erneut bei 15000g für 10 Minuten abzentrifugiert.

Nach Entfernung des Überstandes wurde das DNS-Sediment für 10 Minuten an der Luft getrocknet und anschließend in 100 µl Tris/HCl (pH 8.5) gelöst.

Puffer P1

50 mM Tris/HCL pH 8.0

10 mM EDTA

100 µg/ ml RNase A

Puffer P2

200 mM NaOH

1% (v/v) SDS

Puffer P3

3 M KAc pH 5.5

Puffer PE

Salzarme Waschlösung in 80% EtOH

Puffer QBT
750 mM NaCl
50 mM MOPS pH 7.0
15% (v/v) Isopropanol
0.15% (v/v) Triton X-100

Puffer QC
1 M NaCl
50 mM MOPS pH 7.0
15% (v/v) Isopropanol

Puffer QF
1.25 M NaCl
50 mM Tris/HCl pH 8.5
15% (v/v) Isopropanol

5.4.2 Bestimmung der DNS/RNS-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmungen erfolgten an dem Genequant UV-Spektrometer bei 260 nm.

Nach Sambrook (Sambrook *et al.* 1989) berechnet sich aus den Optischen Dichten ($OD_{260/280}$) die Endkonzentration wie folgt:

1 OD_{260} (dsDNS) 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Soll- $(OD_{260}/OD_{280}) = 1.6-1.8$
1 OD_{260} (ssRNS) 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Soll- $(OD_{260}/OD_{280}) = 1.8-2.0$

Aus dem Verhältnis OD_{260}/OD_{280} konnte auf eventuelle Verunreinigungen durch die Präsenz von aromatischen Aminosäuren zurückgeschlossen werden.

5.4.3 Restriktionsverdaus

Einzel- wie auch Doppelverdaus wurden in Puffern der Firma New England Biolabs (NEB) nach Herstellerangaben durchgeführt. Puffer der Doppelverdaus wurden nach Empfehlung des Herstellers ausgesucht.

Hierzu wurden 1 μg DNS in einem Reaktionsvolumen von 30 μl (in 1x Reaktionspuffer und im Bedarfsfall supplementiert mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA) für 3h oder gegebenenfalls über Nacht mit 5-10 Units (U) der entsprechenden Enzyme verdaut.

5.4.4 Ligation

Pro Ligationsansatz wurden 100 ng bis 1 μg an linearisierten DNS-Fragmenten (in einem molaren Verhältnis von 3:1 von Fragment- zu Plasmidanteil) mit 100 U T4-DNS-Ligase (NEB) für 14h bei 14°C inkubiert und anschließend bei -20°C gelagert oder direkt in die Transformation eingesetzt.

Ligationspuffer:

50 mM Tris/HCl pH 7.8
10 mM MgCl₂
10 mM DTT
1 mM ATP
50 µg/ml BSA

5.4.5 Elektrophoretische Auftrennung der DNS-Fragmente.

Die Trennung erfolgte in horizontalen Gelkammern mit 1%igen bis 1.5%igen Agarosegelen bei einer konstanten Spannung von 120 bis 140V. Als Laufpuffer diente 1xTBE-Puffer versetzt mit 0.03 µg/ml Ethidiumbromid.

Die Detektion der Banden erfolgte bei UV-Licht bei 354 nm und als Längenstandard diente eine fragmentierte 123-Basenpaar-Leiter (Gibco BRL). Die Gele wurden mit einem Herolab CCD-Analysator dokumentiert.

Auftragspuffer:

50 % Glycerin
1 mM EDTA
0.4 % Bromphenolblau
0.4 % Xylencyanol

1x TBE-Puffer:

89 mM Tris
89 mM Borsäure
2 mM EDTA

5.4.6 Isolation von DNS aus Agarosegelen

Zur Isolierung von Restriktionsfragmenten wurden die entsprechenden DNS-Banden ausgeschnitten, abgewogen und mit dem Qiagen Gel Extraktion Kit isoliert.

Jeder Gelblock ($\delta \sim 100$ mg/100 µl) wurde mit dem 3-fachen Volumen an Solubilisierungspuffer QG versetzt und bei 50°C für 10 Minuten gelöst.

Nach Zugabe von einem Volumenanteil Isopropanol und Mischen der Probe wurde das Substrat in einer Qiaquick-Spinsäule für eine Minute bei 14000 upm abzentrifugiert mit 750 µl Puffer PE gewaschen und erneut bei 14000 upm abzentrifugiert. Die Säule wurde durch nochmaliges 1-minütiges Zentrifugieren getrocknet und die DNS mit 2 mal 40 µl 10 mM Tris/HCl pH 8.5 eluiert.

Puffer QG:

Solubilisierungspuffer mit hohem Gehalt an chaotropen Salzen

5.4.7 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte, die weiterverarbeitet wurden, wurden mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Boehringer Mannheim) aufgereinigt.

Die PCR-Ansätze wurden mit dem 4-fachen Probenvolumen mit Bindungspuffer Grün vermischt und die DNS per Zentrifugation (30 Sek. 14000 upm) an die Gelmatrix eines Spinsäulchens gebunden. Nach 2 Waschschritten mit zunächst dem 5-fachen Ausgangsvolumen der PCR-Proben, dann mit 200 µl Waschpuffer Blau wurden die Spinsäulchen durch nochmalige Zentrifugation (1 Minute, 14000 upm) getrocknet und mit 2 mal 40 µl 10 mM Tris/HCl pH 8.5 eluiert.

Bindungspuffer Grün
3 M Guanidinium-Thiocyanat
10 mM Tris/HCl pH 6.6
5% (v/v) Ethanol

Waschpuffer Blau
20 mM NaCl
10 mM Tris/HCl pH 7.5
80% (v/v) Ethanol

5.5 Arbeiten mit RNS

Für sämtliche Arbeiten wurden puderfreie Handschuhe verwendet und sämtliche Glaswaren, Instrumente und benötigtes H₂O mit Diethylpyrocarbonat von RNasen befreit:

Bidestilliertes H₂O wurde für 12h mit 0.01% (v/v) DEPC bei RT gerührt und anschließend autoklaviert.

Glaswaren und Instrumente wurden ebenso 12h lang mit 0.01% (v/v) DEPC inkubiert und anschließend autoklaviert.

5.5.1 Isolierung von Leukozyten-RNS aus Patientenblut

Im Rahmen einer klinischen Studie zur chronisch lymphatischen Leukämie, wurde aus Blutroben die RNS isoliert. Hierzu kam der „QiaAMP RNA Blood Mini Kit“ von Qiagen zum Einsatz.

0,5 bis 1 ml Patientenblut, mit EDTA oder Heparin konserviert, (ca. 1×10^7 Leukozyten) wurden für 20 Minuten auf Eis mit dem 5-fachen Volumen Erythrozytenlyse-Puffer EL inkubiert und gelegentlich gevortext.

Die Zellen wurden bei 400 g für 10 Minuten bei 4°C sedimentiert und der Überstand nebst nicht lysierten Erythrozyten abgezogen. Nach nochmaliger 10-minütiger Inkubation im 2-fachen Volumen Puffer EL bei 4°C wurde erneut abzentrifugiert (400 g; 10 Minuten; 4°C) und der Überstand abgenommen.

Das Sediment wurde in 600 µl Puffer RLT lysiert und Zellrückstände mit QiaShredder-Säulchen abgetrennt (14000 upm; 2 Minuten)

Das Eluat wurde anschließend in 600 µl 70%igem (v/v) Ethanol aufgenommen und zur RNS-Bindung auf Spinsäulchen aufgetragen (12000 upm; 30 Sek.). Es folgten dann Waschschrritte mit 700 µl Puffer RW1 und 2 mal 500 µl Puffer RPE (12000 upm; 30 Sek.) und ein abschließender Zentrifugationsschritt zum Entfernen der letzten Pufferrückstände (14000 upm; 2 Min.)

Die Elution erfolgte mit 2x 40 µl RNase freiem H₂O. Die Konzentration wurde anschließend bei 260 nm gemessen.

5.5.2 Isolierung aus der Zellkultur

1x10⁷ Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und bei 400 g für 10 Minuten abzentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend in 600 µl Puffer RLT lysiert und weiterverarbeitet.

5.5.3 Northern-Blot-Analyse der RNS-Expression

5.5.3.1 Denaturierende Gelelektrophorese

5.5.3.1.1 Herstellung des Agarosegels

1.2 g Agarose wurden in 62.2 ml H₂O aufgekocht und nach Abkühlung auf ca. 60°C mit 20 ml 5x MOPS-Puffer und 17.8 ml 37%igem (v/v) Formaldehyd versetzt und gegossen. Nach 30-minütigen Erstarren bei RT konnte das Gel eingesetzt werden.

5.5.3.1.2 Probenvorbereitung

Je 8 µg an Gesamt-RNS wurden mit 2 µl 5x MOPS, 3.5 µl 37.5%igem Formaldehyd und 10 µl deionisiertem Formamid (Sigma) versetzt und 15 Minuten bei 56°C denaturiert.

Nach 5-minütiger Abkühlung auf Eis wurden 1 µl RNS-Auftragspuffer zugemischt und die Proben auf das Gel aufgetragen.

Der Gellauf erfolgte über Nacht bei 25 V in 1x MOPS-Laufpuffer, versetzt mit 0.03 µg/ml Ethidiumbromid.

Da kein RNS-Mengenstandard mitlief, wurden die Banden der 18S rRNS (2366 BP) und der 28S rRNS (6333 BP) unter UV-Licht mit einem Lineal ausgemessen und dokumentiert.

5x MOPS-Puffer:

0.2 M MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)

50 mM Natriumacetat

5 mM EDTA pH 8.0

RNS-Auftragspuffer:

50% (w/v) Ficoll

1 mM EDTA pH 8.0

4% (w/v) Bromphenolblau

0.4% (w/v) Xylencyanol FF

5.5.3.2 Northern Blot

Das Gel wurde zwecks Entfernung des Formaldehyds für 20 Minuten in 20x SSC geschüttelt (150 upm)

Der Transfer der RNS erfolgte auf eine Hybond N⁺-Membran mit folgendem Versuchsaufbau:

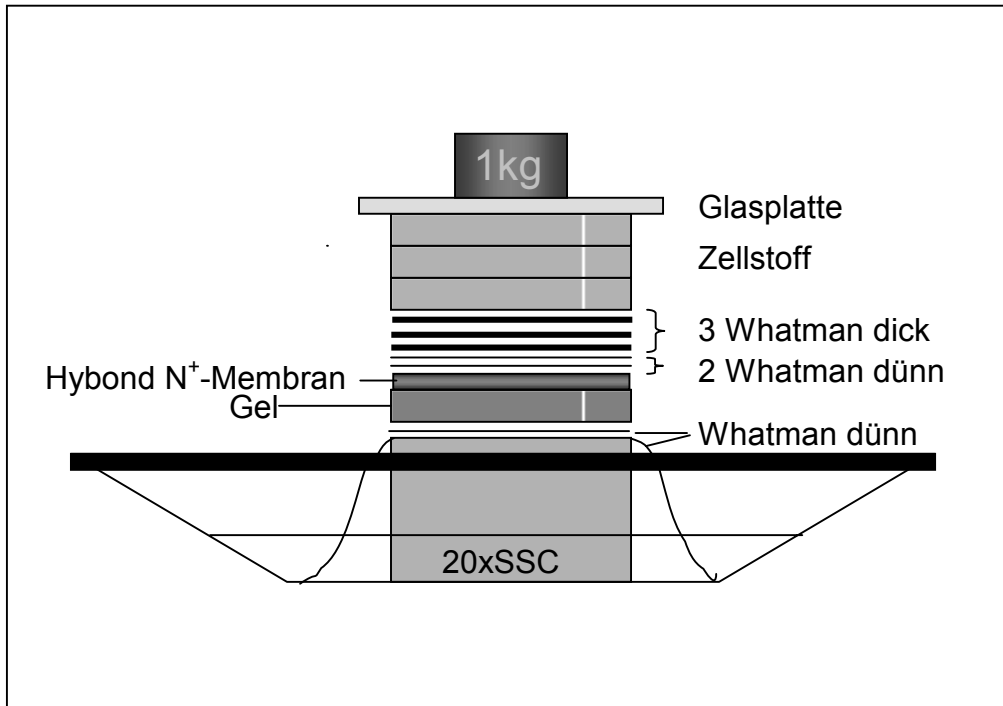


Abb. 12: Schematischer Aufbau des Northern Blots

Whatman-Filterpapiere wurden auf Gelgröße zurecht geschnitten und mit 20x SSC angefeuchtet. Nach Auflegen der Hybond N⁺-Membran und der Filterpapiere wurde jeweils durch Rollen mit einer Pipette Luftblasen entfernt. Zur Vermeidung von ungewollten Flüssigkeitsströmen wurden die Gele an den Rändern mit Parafilm abgedichtet.

Der Transfer erfolgte über Nacht.

Nach Markierung der Geltaschen und Fixierung der RNS unter UV-Licht wurde die Membran für 2 mal 10 Minuten in 2x SSC neutralisiert, luftgetrocknet und 2h bei 80°C gebacken.

20x SSC:

3 M NaCl

300 mM Na-Citrat pH 7.0

5.5.3.3. Nichtradioaktive Hybridisierung

Die nichtradioaktive Hybridisierung basiert auf dem von Boehringer Mannheim entwickelten Digoxigenin (Dig)-System.

Die DNS-Sonden wurden mittels der Polymerase Kettenreaktion mit

Dig-markierten dUTP (Digoxigenin-11-2'-deoxy-uridin-5'-triphosphat) markiert.

Der Nachweis erfolgte mittels eines mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Anti-Dig-Antikörpers („Anti-Digoxigenin-AK, Fab fragments“) über eine Chemolumineszenzreaktion des Substrates CDP* (Promega).

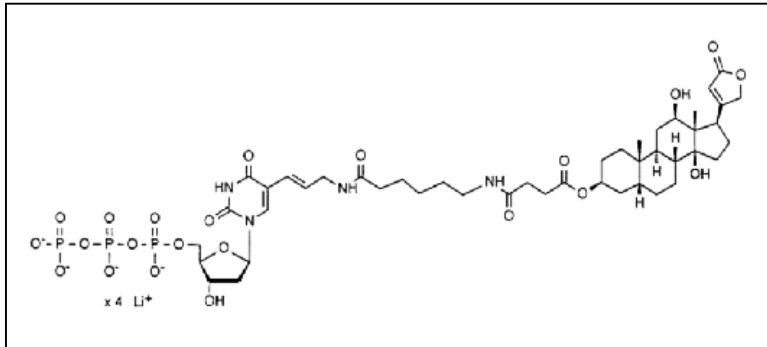


Abb.13: Strukturformel des Digoxigenin-11-2'-deoxy-uridin-5'-triphosphat

5.5.3.3.1 Prähybridisierung

Die gebackenen Membranstreifen wurden zurecht geschnitten, mit etwas 2x SSC angefeuchtet und mit 5 ml vorgewärmter Prähybridisierungslösung in Plastikmembranen eingeschweißt. Anschließend erfolgte die Prähybridisierung für 1 Stunde bei 68°C.

5.5.3.3.2 Vorbereitung der Dig-Sonden

50 ng an Dig-markierten DNS-Sonden wurden in 100 µl H₂O bidest. für 10 Minuten in kochendem Wasser denaturiert und anschließend für 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Unmittelbar vor der Hybridisierung wurde die Sonde zu 5 ml vorgewärmten Prähybridisierungsmix gegeben.

5.5.3.3.3 Hybridisierung

Nach 1h Prähybridisierung wurde die Prähybridisierungslösung in den Plastikmembranen mit 5 ml Hybridisierungslösung ersetzt und die Proben über Nacht bei 68°C inkubiert.

5.5.3.4 Waschen der Proben

Nach dem Ausschneiden der Probenmembranen aus den Plastikmembranen wurden überschüssige Dig-DNS-Sonden durch 3-maliges gemeinsames Waschen mit je 50 ml Waschlösung bei 68°C entfernt.

2x SSC:

0.3 M NaCl

30 mM Na-Citrat pH 7.0

Prähybridisierungslösung:

0.25 M Na₂HPO₄ pH 7.2

1 mM EDTA

20% (w/v) SDS

0.5% (w/v) Blocking-Pulver (Boehringer-Mannheim)

Hybridisierungslösung:

10 ng/ml Dig-11-dUTP markierte Sonde in Prähybridisierungslösung

Waschpuffer:

20 mM Na₂HPO₄ pH 7.2

1 mM EDTA

1% (w/v) SDS

5.5.3.5. Immundetektion

5.5.3.5.1 Blockierung der freien Bindungsstellen auf den Probenmembranen.

Alle folgenden Schritte wurden bei RT und unter Schütteln (150 upm) durchgeführt. Nachdem die Probenmembranen für 5 Minuten mit 50 ml Waschpuffer 1 äquilibriert wurden, wurden unspezifische Proteinbindungsstellen auf den Membranen mit 50 ml des Block-Puffers 2 für 60 Minuten abgesättigt (150 upm).

5.5.3.5.2 Auftragung des Anti-Digoxigenin-AK-Fab-Fragments

Das AK-Fragment wurde im Verhältnis 1:15000 in je 5 ml Block-Puffer 2 (Konjugat-Puffer 3) verdünnt und für 30 Minuten mit den Probenmembranen inkubiert. Überschüssiges AK-Fragment wurde durch 4-maliges Waschen mit Waschpuffer 1 entfernt und die Membranen mit 5-minütiger Inkubation in Substratpuffer 4 für die Detektionsreaktion der alkalischen Phosphatase äquilibriert.

5.5.3.5.3 Herstellung der Chemilumineszenzsubstratlösung 5

Pro Probenmembran wurden 80 µl einer 12.5 mMolaren CDP*-Lösung (Promega) in 4 ml Substratpuffer 4 verdünnt.

5.5.3.5.4 Detektion der Chemilumineszenz

Die Probenmembranen wurden für 5 Minuten mit der oben genannten Substratlösung 5 in Plastikmembranen inkubiert, überschüssige Lösung verstrichen und

eingeschweißt. Es folgte die Exposition der Membranen mit einem Röntgenfilm für einen Zeitraum zwischen 30 Minuten und 3 Stunden.

Waschpuffer 1:

3 M NaCl

0.1 M Maleinsäure pH 8.0

0.3% (v/v) Tween 20

Maleinsäurepuffer:

0.1 M Maleinsäure pH 7.5

0.15 M NaCl

10x Blocking-Reagenz:

10% (w/v) Blocking-Pulver (Boehringer Mannheim) in Maleinsäurepuffer

Block-Puffer 2:

0.5% (v/v) Blocking-Reagenz in Waschpuffer 1

Konjugat-Puffer 3:

Anti-Digoxigenin-AK-Fab-Fragment 1:15000 verdünnt in Block-Puffer 2

Substrat-Puffer 4:

0.1 M Tris/HCl pH 9.5

50 mM MgCl₂

0.1 M NaCl

Chemilumineszenzsubstratlösung 5:

12.5 mM CDP* 1:50 in Substrat-Puffer 4 verdünnt

5.6 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation von kurzen DNS-Abschnitten kam die Polymerasen-Kettenreaktion nach Higuchi (Higuchi *et. al* 1988) zum Einsatz.

Mit Hilfe von sequenzspezifischen Oligonukleotid-Paaren von durchschnittlich 20 Basenpaaren Länge, wobei jeweils ein Oligonukleotid-Primer zum einen Mal einem ausgewählten Abschnitt des Leitstrangs (F-Primer), das andere Mal eines ausgewählten Abschnitts des Gegenstrangs (R-Primer) entspricht, konnten in einem 3-phasigen Reaktionszyklus selektiv Sequenzabschnitte mit einer Polymerase amplifiziert werden:

1. Denaturierung der Matrize
2. Hybridisierung der Primer
3. Extension der Primer durch die Polymerase

Sämtliche Reagenzien wurden auf Eis zusammenpipettiert und bis zur PCR-Reaktion gekühlt aufbewahrt.

Alle PCR-Läufe wurden auf einem PCR-Cycler PTC-200 (MJ Research) durchgeführt.

Folgende Polymerasen bzw. Kits kamen zum Einsatz:

Vent (exo⁻) Polymerase (NEB)

ExpandTM High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim)

Taq-Polymerase (Promega)

ABI PRISM Big Dye Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer)

5.6.1 „Colony-PCR“ mit Taq-Polymerase

Im Verlauf der Klonierungsarbeiten wurde es notwendig eine schnelle Untersuchung der Zwischenkonstrukte in pBSII SK (-) zu ermöglichen.

Hierfür wurden die Klone mit Hilfe ausgewählter, flankierender Primerpaare auf erfolgreiche Insertion des zu klonierenden DNS-Fragments mit der Taq-Polymerase (*Thermophilus Aquaticus*) untersucht.

Klone wurden von selektierenden LB-Agarplatten gepickt und in 50 µl H₂O bidest. für 10 Minuten aufgekocht. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden abzentrifugiert (2 Minuten; 14000 upm) und 2 µl des Überstandes in die PCR-Reaktion eingesetzt.

PCR-Ansatz

10X Polymerasepuffer	3 µl
dNTP-Mix 1:10 (Endkonz.: ~ 100 µM)	1.2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
Primer	je 50 pmol
Substrat	2 µl
Taq-Polymerase	1 U
H ₂ O ad 30 µl	

10x Polymerasepuffer:
 100 mM Tris/HCl pH 9.0
 500 mM KCl
 1% (v/v) Triton X-100

dNTP-Mix 1:10:
 (je 2.5 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)

Für die Denaturierung der DNS wurde zunächst für 2 Minuten bei 95°C inkubiert, gefolgt von 35 PCR-Zyklen:

Denaturierung:	1 Min.	95°C
Hybridisierung:	40 Sek.	$T_m - 3$
Elongation:	1 Min.	72°C

Zur Fertigstellung aller noch unvollendeten Synthesestränge wurde abschließend für 5 Minuten bei 72°C inkubiert.

Der Nachweis der PCR-Amplifikate erfolgte über Gelelektrophorese auf 1.2%igen Agarosegelen.

5.6.2 ExpandTM High Fidelity PCR System

Um EGFP-Fusionskonstrukte der Adenosinrezeptoren zu etablieren, mußten Adaptersequenzen und Restriktionsschnittstellen in den C-terminalen Bereich der Rezeptorsequenzen eingeführt werden, was mit speziell zusammengestellten Primersequenzen über PCR-Amplifikation erreicht wurde.

Für diesen Zweck kam das ExpandTM High Fidelity PCR System zum Einsatz, dessen Mix aus Taq-Polymerase und Pwo-Polymerase (*Pyrococcus woesei*) die schnelle Prozessivität der Taq-Pol. mit der Lesegenauigkeit der Pwo-Pol. verbindet.

PCR-Ansatz

High Expand HF Puffer mit 15 mM MgCl ₂	5 µl
dNTP-Mix 1:10 (Endkonz.: ~ 100 µM)	2 µl
Primer	je 50 pmol
DNS-Template	100 ng
High Expand Enzym Mix	0.4 µl (1.3 U)
H ₂ O ad 50 µl	

Für die Denaturierung der DNS wurde zunächst für 2 Minuten bei 94°C inkubiert, gefolgt von 35 PCR-Zyklen:

Denaturierung:	30 Sek.	95°C
Hybridisierung:	40 Sek.	$T_m - 3$
Elongation:	1 Min.	72°C

Zur Fertigstellung aller noch unvollendeten Synthesestränge wurde abschließend für 7 Minuten bei 72°C inkubiert.

Der Nachweis der PCR-Amplifikate erfolgte über Gelelektrophorese auf 1.2%igen Agarosegelen.

5.6.3 Darstellung der Dig-dUTP-markierten Gensonden

Zur Herstellung der im nichtradioaktiven Northern-Blot verwendeten DNS-Sonden wurden 300 bis 800 BP lange Teilsequenzen der interessierenden Gene per PCR mit einem Dig-dUTP enthaltenden Desoxy-Nukleotidmix amplifiziert. Als Polymerase kam hierbei die Vent (exo⁻)-Polymerase (*Thermococcus litoralis*) zum Einsatz.

PCR-Ansatz

10x Vent-Polymerase-Mix	3 µl
Dig-dUTP-dNTP-Mix	3 µl
Primer	je 50 pmol
DNS-Template	100 ng
Vent (exo ⁻) Pol.	0.5 µl (1 U)
H ₂ O ad 30 µl	

Dig-dUTP-dNTP-Mix:

Je 1 mM dATP, dGTP, dCTP sowie 0.65 mM dTTP und 0.35 mM Dig-dUTP.

Für die Denaturierung der DNS wurde zunächst für 2 Minuten bei 95°C inkubiert, gefolgt von 35 PCR-Zyklen:

Denaturierung:	30 Sek.	95°C
Hybridisierung:	40 Sek.	T _m -3
Elongation:	1 Min.	72°C

Zur Fertigstellung aller noch unvollendeten Synthesestränge wurde abschließend für 5 Minuten bei 72°C inkubiert. Die PCR-Produkte wurden anschließend aufgereinigt und die Konzentration bei 260 nm bestimmt.

5.6.4 Sequenzierung klonierter PCR-Produkte

Nach der Zwischenklonierung der Adaptersequenzen des EGFP-Fusionskonstruktes wurde die Sequenz auf beiden Strängen mit Hilfe des „Big Dye Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing“ Kits (Perkin Elmer) überprüft.

Dieser funktioniert nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et. al* 1977) mit jeweils 4 unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Di-deoxy-NTPs.

„Cycle Sequencing“-Ansatz:

Plasmid-DNS	300 ng
Primer	2.5 pmol
„Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing“-Mix	2 µl
H ₂ O ad 10 µl	

„Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing“-Mix:

Enthält Puffer, AmpliTaq DNS Polymerase, dNTPs, dITP, Big Dye markierte ddNTPs.

Nach 2-minütiger Denaturierung bei 96°C folgten 25 PCR-Zyklen:

30 Sek.	96°C
15 Sek.	T_M-3
4 Min.	60°C

Nach Beendigung der zyklischen Sequenzreaktion wird der Reaktionsansatz (10 µl) mit 1 µl 3 M Na-Acetat (pH 5.0) und 25 µl absolutem Ethanol für 10 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend für 25 Minuten bei 14000 upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNS-Sediment mit 150 µl 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und für 15 Minuten in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

Die automatisierte Sequenzbestimmung erfolgte mit dem Sequenzierautomaten ABI 377 (Perkin Elmer) in der Abteilung der pädiatrischen Genetik (Prof. Murken) der medizinischen Klinik Innenstadt.

5.7 RT-PCR

RNS-Moleküle können mit Hilfe einer reversen Transkriptase (RT) in komplementäre DNS (cDNS) umgeschrieben werden und über Amplifikation mittels der PCR noch in kleinsten Konzentrationen nachgewiesen werden. Somit stellt die RT-PCR eine sehr empfindliche Methode zur Untersuchung des Transkriptionsniveaus ausgewählter Gene dar.

5.7.1 Reverse Transkription

Zur Synthese eines cDNS-Pools aller prozessierten Transkripte des Gesamt-RNS-Templates kam die AMV (Avian Myeloblastosis Virus) Reverse Transkriptase (Promega) zum Einsatz, wobei ein Poly-d(T)₁₈-Primer (Pharmacia) als initiiender Primer verwendet wurde.

1 µg an Gesamt-RNS wurden in 10 µl Volumen 10 Minuten bei 65°C denaturiert und für 5 Minuten auf Eis gestellt.

Anschließend wurden 20 µl an RT-Premix zugegeben und für 45 Minuten bei 42°C inkubiert. Falls erforderlich, erfolgte die Lagerung anschließend bei -20°C.

RT-Premix:

5X Reaktions-Puffer	6 µl
Poly-d(T) ₁₈ -Primer	4 pmol
dNTP-Mix 1:10 (Endkonz.: ~ 100 µM)	1.2 µl
MgSO ₄ (25 mM)	1.8 µl
Gesamt-RNS	1 µg
H ₂ O ad 20 µl	

5X Reaktions-Puffer:

250 mM Tris-HCl pH 8.3
250 mM KCl
2.5 mM Spermidin
50 mM DTT.

5.7.2 Qualitative RT-PCR

Zur qualitativen Messung der Genexpression der relevanten Gene wurde in einer PCR mit genspezifischen Primern die erhaltene cDNS amplifiziert und mittels Gelelektrophorese (1.2%ige Agarosegele) nachgewiesen (Siehe auch Primertabelle unter 4.7.3.)

Je 3 µl (entspricht ca. 100 ng RNS-Ausgangsmenge) des RT-Ansatzes wurden für ein PCR-Volumen von 30 µl eingesetzt. Zur Auflösung eventueller Sekundärstrukturen der cDNS wurde 1 M Betain zugegeben.

PCR-Ansatz

10x Vent-Polymerase-Mix	3 µl
dNTP-Mix 1:10 (Endkonz.: ~ 100 µM)	1.2 µl
Betain (5 M)	6 µl
Primer	je 50 pmol
cDNS-Template	3 µl (100 ng)
Vent (exo ⁻) Pol.	0.5 µl (1 U)
H ₂ O ad 30 µl	

Die DNS wurde zunächst für 2 Minuten bei 95°C denaturiert, gefolgt von 40 PCR-Zyklen:

Denaturierung:	30 Sek.	95°C
Hybridisierung:	40 Sek.	T _m -3
Elongation:	45 Sek.	72°C

Zur Fertigstellung aller noch unvollendeten Synthesestränge wurde abschließend für 5 Minuten bei 72°C inkubiert. Der Nachweis erfolgte über Gelelektrophorese mit 1.2%igen Agarosegelen.

5.7.3 Semiquantitative, kompetitive RT-PCR

Für einen semiquantitativen Nachweis der Genexpression der zu untersuchenden Gene, wurde eine kompetitive RT-PCR mit internen heterologen DNS-Standards etabliert.

Diese heterologen DNS-Standards (Kompetitoren) wurden so synthetisiert, daß an den 3'-und 5'-Enden des Kompetitors dieselben Primer-Bindungsstellen erzeugt wurden, die auch für den PCR-Nachweis der gewünschten Gene Verwendung fanden. Hierbei wurde die Länge des DNS-Standards so gewählt, daß eine deutliche Differenz (bis zu 50%) zur PCR-Fragmentlänge des zu untersuchenden Gens bestand.

Bei Zugabe des heterologen Standards in genau definierter Menge zum PCR-Ansatz konkurrierten Kompetitor und die spezifische cDNS um das gleiche Primerpaar, wodurch eine Standardisierung der einzelnen PCR-Reaktionen ermöglicht wurde.

5.7.3.1 Herstellung der kompetitiven, heterologen DNS-Standards

Die Konstruktion der heterologen DNS-Kompetitoren erfolgte in Anlehnung an den PCR MIMIC Construction Kit der Firma „Clontech Laboratories, Inc.“ (Heidelberg) in 2 Stufen.

Zunächst wurde ein Kompetitor-Primerpaar (siehe Kompetitoren-Primer unter 4.7.4) verwendet, welches sowohl mit dem nicht homologen DNS-Fragment (es wurden dafür 2 pBSII SK (-) Konstrukte als Matrize verwendet, die mit den genannten Primerpaar PCR-Fragmente von 300 BP oder 500 BP ergaben), als auch mit dem gewünschten Zielgen hybridisierten. Hierdurch wurden die Primersequenzen des Zielgens an den Enden des heterologen DNA-Standards erzeugt.

PCR-Ansatz

10x Vent-Polymerase-Mix	5 µl
dNTP-Mix 1:10 (Endkonz.: ~ 100 µM)	2 µl
Primer (Kompetitor F/R-Primer)	je 50 pmol
pBSII SK (-)	100 ng
Vent (exo ⁻) Pol.	0.5 µl (1 U)
H ₂ O ad 50 µl	

Die DNS wurde zunächst für 2 Minuten bei 95°C denaturiert, gefolgt von 30 PCR-Zyklen:

Denaturierung:	30 Sek.	95°C
Hybridisierung:	40 Sek.	T _m -3
Elongation:	45 Sek.	72°C

Zur Fertigstellung aller noch unvollendeten Synthesestränge wurde abschließend für 5 Minuten bei 72°C inkubiert.

Nach Aufreinigung der Produkte der ersten PCR, wurde 1/10 des erhaltenen Produktes mit den genspezifischen Primern amplifiziert.

PCR-Ansatz

10x Vent-Polymerase-Mix	5 µl
dNTP-Mix 1:10 (Endkonz.: ~ 100 µM)	2 µl
Primer	je 50 pmol
Gereinigtes PCR-Produkt der 1. Amplifikationsrunde	8 µl
Vent (exo ⁻) Pol.	0.5 µl (1 U)
H ₂ O ad 50 µl	

Die DNS wurde wiederum für 2 Minuten bei 95°C denaturiert, gefolgt von 30 PCR-Zyklen:

Denaturierung:	30 Sek.	95°C
Hybridisierung:	40 Sek.	T _m -3
Elongation:	45 Sek.	72°C

Zur Fertigstellung aller noch unvollendeten Synthesestränge wurde abschließend für 5 Minuten bei 72°C inkubiert.

Nach Aufreinigung des Kompetitors wurde die Konzentration bei 260 nm quantifiziert und die molare Konzentration in Abhängigkeit von der gewählten Kompetitorgröße mit folgender Formel berechnet:

$$K = \frac{xBP \cdot 660g}{mol \cdot BP} = \frac{g}{mol}$$

K = Molgewicht des DNS-Kompetitors mit x BP

$$C \cdot \frac{1}{K} \cdot \frac{g}{10^6 \mu g} \cdot \frac{10^6 \mu mol}{mol} \cdot \frac{10^{12} attomol}{\mu mol} = X \frac{attomol}{\mu l}$$

C = Konzentration des DNS-Kompetitors in µg/µl

X = molare Konzentration des DNS-Kompetitors

Mit Glykogen-haltigem Wasser (10 µg/ml) wurde eine Arbeitskonzentration von 100 attomol/µl hergestellt und bei –20°C gelagert.

Zur Bestimmung des besten Meßverhältnisses von cDNS-Signal zu Kompetitor-Signal (angestrebt wurden Verhältnisse von ca. 1:1) wurden Verdünnungsreihen der jeweiligen Kompetitoren angesetzt und bei konstanter cDNS-Menge unter gleichen PCR-Bedingungen verglichen.

PCR-Ansatz

10x Vent-Polymerase-Mix	3 µl
dNTP-Mix 1:10 (Endkonz.: ~ 100 µM)	1.2 µl
Betain (5 M)	6 µl
Primer	je 50 pmol
Kompetitor	1 µl (10 ⁻² amol bis 0.5 amol)
cDNS-Template	3 µl (100 ng)
Vent (exo ⁻) Pol.	0.5 µl (1 U)
H ₂ O ad 30 µl	

Die DNS wurde zunächst für 2 Minuten bei 95°C denaturiert, gefolgt von 40 PCR-Zyklen:

Denaturierung:	30 Sek.	95°C
Hybridisierung:	40 Sek.	T _m -3
Elongation:	45 Sek.	72°C

Zur Fertigstellung aller noch unvollendeten Synthesestränge wurde abschließend für 5 Minuten bei 72°C inkubiert

5.7.3.2 Densitometrische Auswertung der semiquantitativen RT-PCR-Signale

Die amplifizierten PCR-Signale der kompetitiven RT-PCR wurden mit Hilfe des Bildanalyse-Programms *NIH Image 1.61* bzw. *Scion Image 4.0.2* digital erfaßt und anschließend densitometrisch ausgewertet.

Jedes einzelne spezifische DNS-Signal eines gemessenen Gens wurde eingelesen, der Hintergrund des Agarosegels abgezogen und das Verhältnis der Meßwerte (relative Einheiten) für die zu detektierende cDNS und den dazugehörigen Kompetitor bestimmt. Es erfolgte ein Abgleich mit einem parallel mitgelaufenen semiquantitativen RNS-Mengenstandard, für den das Expressionsniveau des „Housekeeping“-Gens Phosphoglycerat-Kinase 1 (PGK1) verwendet wurde.

6 Ergebnisse

6.1 Darstellung der EGFP-Fusionskonstrukte

Für eine einfache Detektion der Transfektionseffizienz in den Modellsystemen wurden Fusionskonstrukte der 4 verschiedenen AdoR-Rezeptorsubtypen mit einem C-terminal gelegenen EGFP-Anhang konstruiert. Hierdurch war ein einfacher, fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Fusionskonstrukt-Expression bei 488 nm möglich.

Bei allen Konstrukten wurde nach dem folgenden Schema vorgegangen:

1. Klonierung des Fusionsadapters (per PCR modifizierter C-Terminus der jeweiligen AdoR-Sequenz) in pBS II SK (-)
2. Ligation der gesamten AdoR-EGFP-cDNS-Sequenz in pEGFP-N1.

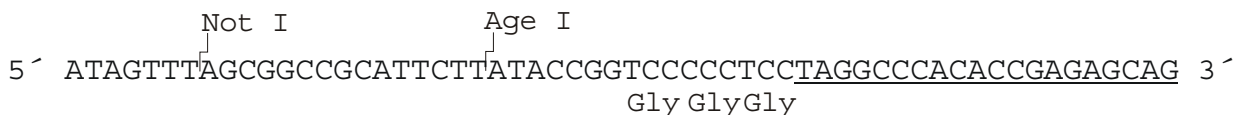
6.1.1 A2bAdoRpEGFP-N1

6.1.1.1 Konstruktion des modifizierten C-Terminus

Durch Auswahl geeigneter Primerpaare wurde das Stop-Codon des AdoR-ORF deletiert, ein kurzer Gly₃-Linker und diverse Restriktionsschnittstellen zur Klonierung eingefügt.



Sequenz des GFPA2bF1-Primer. Zu AdoR homologe Sequenzen wurden unterstrichen.



Sequenz des GFPA2bR1-Primer (Komplementärsequenz). Zu AdoR homologe Sequenzen wurden unterstrichen.

Das PCR-Produkt wurde über die Sac I-/Not I-Restriktionsschnittstellen in pBS II SK (-) einkloniert (pBS II-P1)

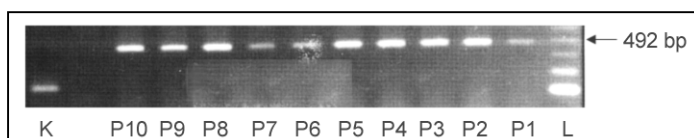


Abb. 14: „Colony-PCR“ der Klone pBS II-P1 bis -P10. Als Primer wurden die pBS-MCS flankierenden T3- und T7-Primer verwendet. Die erfolgreiche Insertion des PCR-Produktes wurde mit einem Amplifikat von ca. 500 BP nachgewiesen. Als Kontrollansatz (K) diente der originale pBS-II SK (-) (ca. 150 BP). L: 123BP-DNS-Leiter

Nach der Insertion der EGFP-cDNS-Sequenz zwischen den Age I- und Not I-Schnittstellen wurde das Zwischenkonstrukt (A2bpBS II-EGFP-P1) sequenziert.

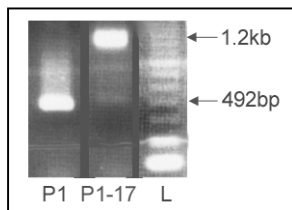


Abb. 15: „Colony-PCR“ des A2bpBS II-EGFP- Klons P1-17. Die Insertion der EGFP-Sequenz in pBS II-P1 führt mit den T3/T7-Primern zu einem PCR-Produkt von ca. 1.2 kB Länge. Als Kontrolle diente pBS II-P1 (P1; 500 BP). Für die folgenden Klonierungsschritte wurde daraufhin der Klon P1-17 sequenziert.

6.1.1.2 Etablierung des Fusions-Konstruktes in pEGFP-N1

Das A2bAdoR-Fusions-Konstrukt wurde über eine 3-Komponenten-Ligation des N-Terminus des A2bAdoR-Gens (pRc/CMV-A2bAdoR (Sma I/BstE II)) mit dem modifizierten C-Terminus (A2bpBS II-EGFP-P1-17 (BstE II/Age I)) in den Expressionsvektor pEGFP-N1 (linearisiert mit Sma I/Age I) im molarem Verhältnis von 3:3:1 erhalten.

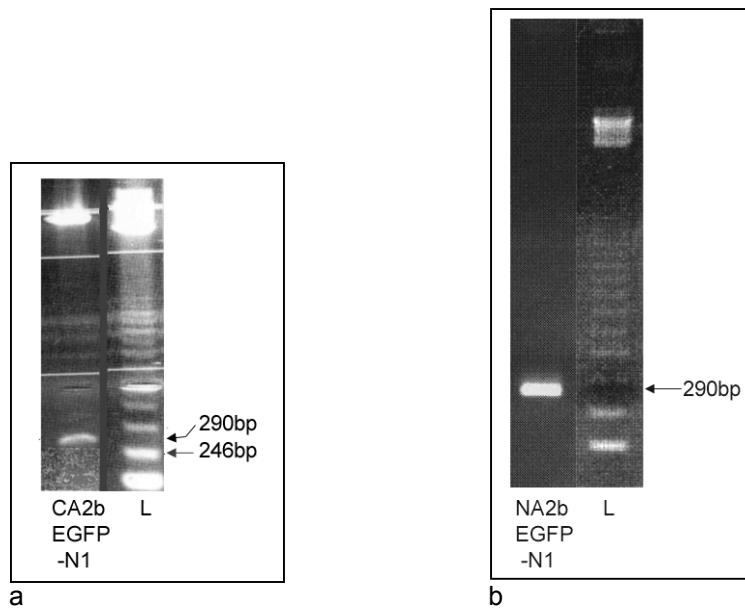


Abb. 16: Nachweis der erfolgten Insertion des C-Terminus des A2bAdoR-EGFP-Konstruktes in den Expressionsvektor pEGFP-N1. Verdau des A2bEGFP-N1-Konstruktes mit BstE II und Age I ergab das zu erwartende Fragment (CA2bAdoR) von ca. 290 BP Länge (a). Der Nachweis der erfolgreichen Insertion des N-Terminus erfolgte mittels PCR mit dem im N-Terminus gelegenen Primern A2bMF/R (siehe auch 4.7.3), die das zu erwartende Produkt von 290 BP amplifizierten (b).

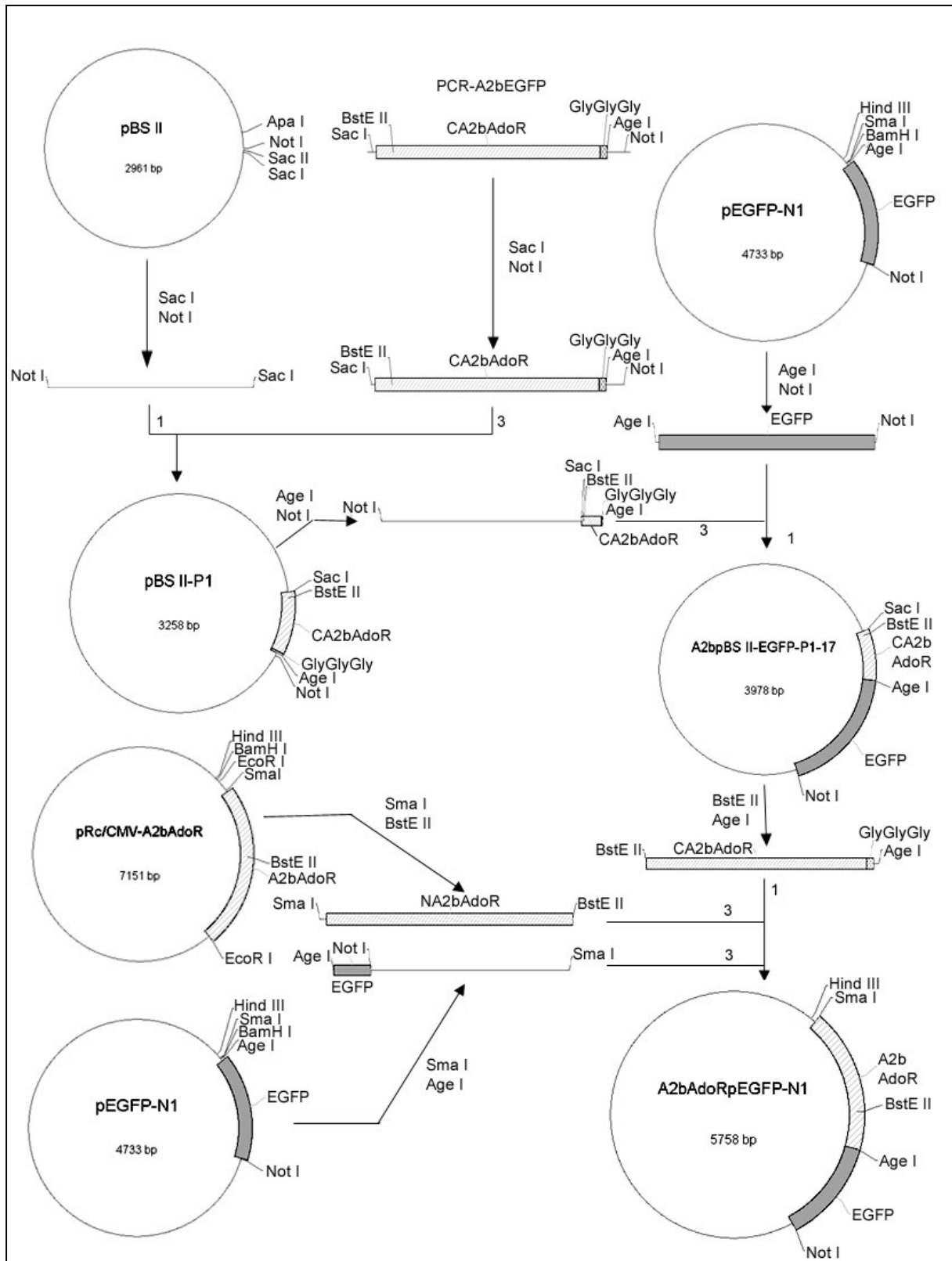


Abb. 17: Klonierungsschema des A2bAdoRpEGFP-N1-Konstruktes.

Die Adaptersequenz des Fusionskonstruktes (PCR-A2bEGFP) wurde zunächst über Sac I/Not I in pBS II SK (-) kloniert (pBS II-P1) und anschließend die EGFP-Sequenz über Age I/Not I insertiert (A2bBS II-EGFP-P1-17). Das endgültige Konstrukt erhielt man über eine 3-Komponenten-Ligation der Adaptersequenz (CA2bAdoR mit BstE II/Age I aus A2bBS II-EGFP-P1-17 geschnitten) und des N-Terminus des A2bAdoR-Gens (NA2bAdoR aus pRc/CMV-A2bAdoR über Sma I/BstE II-Verdau) mit dem mit Sma I/Age I linearisierten pEGFP-N1-Vektor.

6.1.2 A2aAdoRpEGFP-N1

6.1.2.1 Konstruktion des modifizierten C-Terminus

Wiederum wurde mit Primern analog zu den oben dargestellten per PCR aus der C-terminal gelegenen A2aAdoR-Sequenz ein geeigneter Fusionsadapter erzeugt, der über die BstE II/Age I-Schnittstellen in das bereits vorhandene pBS II-Konstrukt (A2bpBS II-EGFP-P1) einkloniert und anschließend sequenziert wurde.

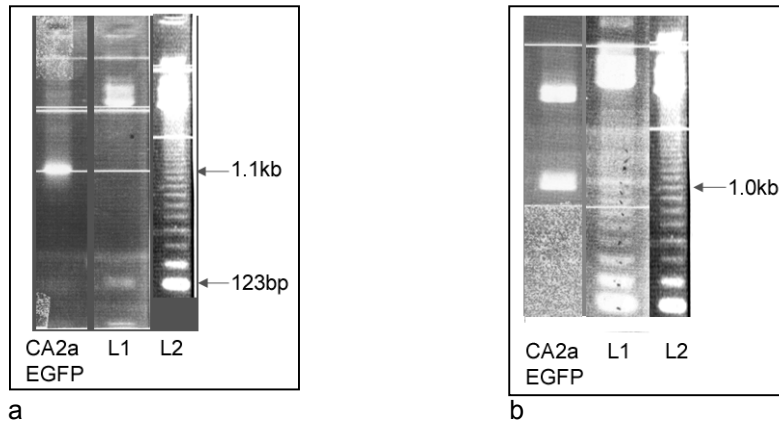


Abb. 18: (a) „Colony-PCR“ des A2apBS II-EGFP-Konstruktes. Die Insertion der modifizierten A2aAdoR-Sequenz in A2bpBS II-P1-17 führt mit den T3-Primer, sowie einem N-terminal gelegenen EGFP-Rückprimer (GFPSeqR) zu einem PCR-Produkt von ca. 1.1 kB Länge. (b) Restriktionsverdau des A2apBS II-EGFP-Konstruktes. Verdau mit BstE II und Age führten zu dem erwarteten Fragment (CA2aEGFP von 440 BP Länge. Für die folgenden Klonierungsschritte wurde daraufhin der dargestellte Klon sequenziert. Für eine bessere Übersicht über die Fragmentlängen wurde neben der originalen Basenpaarleiter (L1) eine entsprechend angepaßte 2. Leiter (L2) in das Bild einkopiert.

6.1.2.2 Etablierung des A2aAdoR-Fusions-Konstruktes in pEGFP-N1

Das A2aAdoR-Fusions-Konstrukt erhielt man über eine 3-Komponenten-Ligation (3:3:1 molares Verhältnis) des N-Terminus des A2aAdoR-Gens (pRc/CMV-A2aAdoR (Hind III/BstE II)) mit dem modifizierten C-Terminus (A2apBS II-EGFP-P1-17 (BstE II/Age I)) in den Expressionsvektor pEGFP-N1 (linearisiert mit Hind III/Age I).

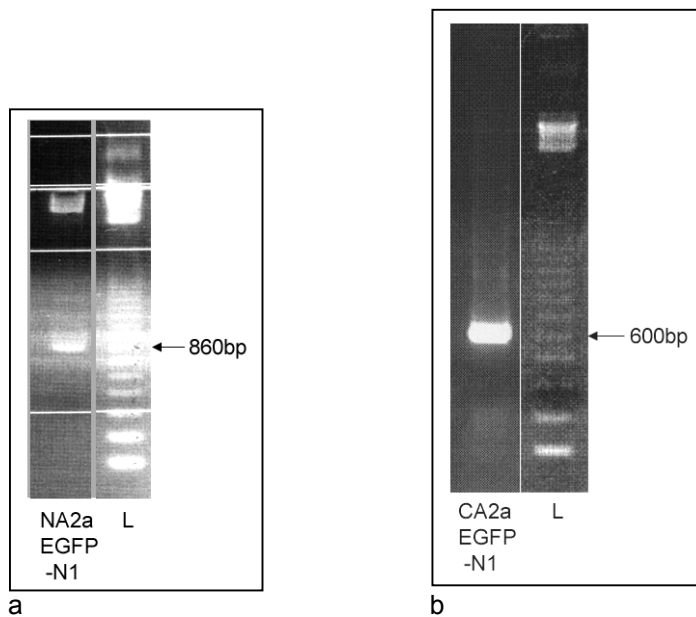


Abb. 19: (a) Nachweis der erfolgten Insertion des N-Terminus des A2aAdoR-EGFP-Konstruktes in den Expressionsvektor pEGFP-N1. Verdau des A2aEGFP-N1-Konstruktes mit BstE II und Hind III ergab das zu erwartende Fragment (NA2aAdoR) von ca. 860 BP Länge. (b) Der Nachweis der erfolgreichen Insertion des C-Terminus erfolgte mittels PCR mit dem im C-Terminus gelegenen Primern A2aSeqF1/R1 (siehe 4.7.1.2 und 4.7.6), die das zu erwartende Produkt von 600 BP amplifizierten.

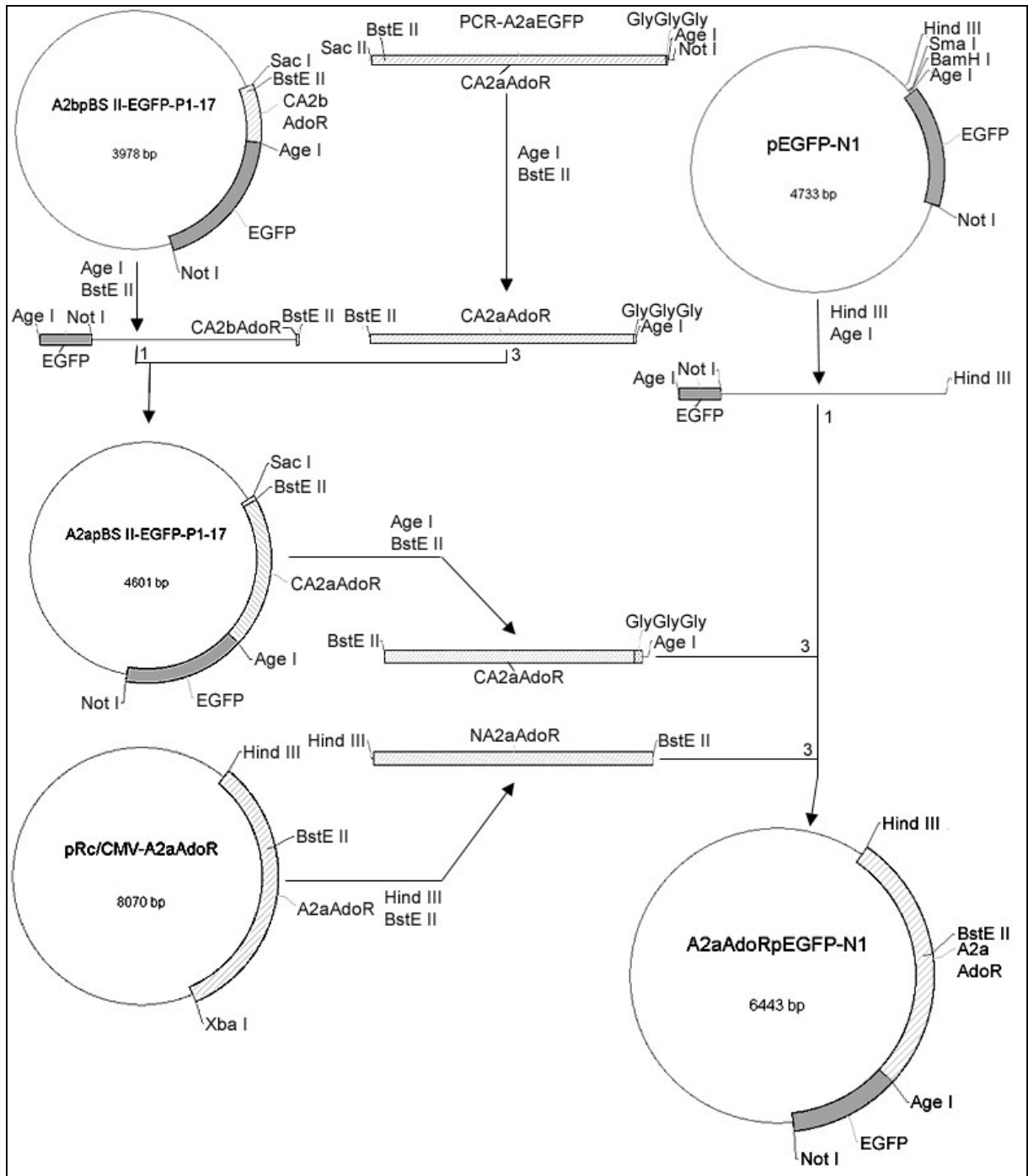


Abb. 20: Klonierungsschema des A2aAdoRpEGFP-N1-Konstruktes.

Die Adaptersequenz des Fusionskonstruktes (PCR-A2aEGFP) wurde über Austausch der CA2bAdoR-Gensequenz über BstE II/AGE I in A2bpBS II-EGFP-P1-17 einkloniert (A2apBS II-EGFP-P1-17). Das endgültige Konstrukt erhielt man über eine 3-Komponenten-Ligation der Adaptersequenz (CA2aAdoR mit BstE II/AGE I aus A2apBS II-EGFP-P1-17 geschnitten) und des N-Terminus des A2aAdoR-Gens (NA2aAdoR aus pRc/CMV-A2aAdoR über Hind III/BstE II-Verdau) mit dem mit Hind III/AGE I linearisierten pEGFP-N1-Vektor.

6.1.3 A3AdoRpEGFP-N1

6.1.3.1 Konstruktion des modifizierten C-Terminus

Wiederum wurde mit Primern analog zu den oben dargestellten per PCR aus der C-terminal gelegenen A3AdoR-Sequenz für die Klonierung geeignete Restriktionschnittstellen (Sac I; Age I; Not I) und der Gly₃-Linker erzeugt und der Fusionsadapter mittels BstE II und Age I in das bereits vorhandene A2aAdoRpBS II-Konstrukt einkloniert (A3pBS II-EGFP-P1). In der „Colony-PCR“ positiv detektierte Klone wurden anschließend sequenziert.

6.1.3.2 Etablierung des A3AdoR-Fusions-Konstruktes in pRc/CMV

Im Falle des A3AdoR-Konstruktes wurde zunächst in pRc/CMV-A3AdoR einkloniert. Hierbei wurde der komplette C-Terminus des A3AdoR-Fusionsadapters mit angehängter EGFP-Sequenz über die BstE II- und Apa I-Schnittstellen im molaren Verhältnis von 3:1 in pRc/CMV-A3AdoR einligiert.

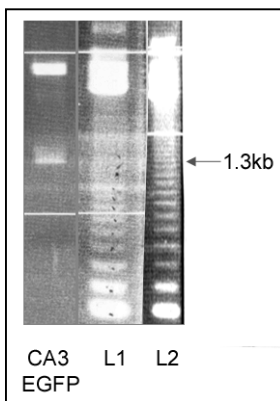


Abb. 21: Restriktionsverdau des pRc/CMV-A3AdoR-EGFP-Konstruktes. Verdau mit BstE II und Apa I führte zu dem erwarteten Fragment (CA3EGFP) von ca. 1.3 kB Länge. Zur besseren Übersicht wurde eine zweite angepaßte Basenpaarleiter einkopiert (L2).

6.1.3.3 Etablierung des A3AdoR-Fusions-Konstruktes in pEGFP-N1

A3AdoRpEGFP-N1 erhielt man über die Ligation (3:1 molares Verhältnis) der modifizierten A3AdoR-Gesamtsequenz (pRc/CMV-A3AdoR-EGFP (BamH I/Age I)) in den Expressionsvektor pEGFP-N1 (linearisiert mit BamH I/Age I).

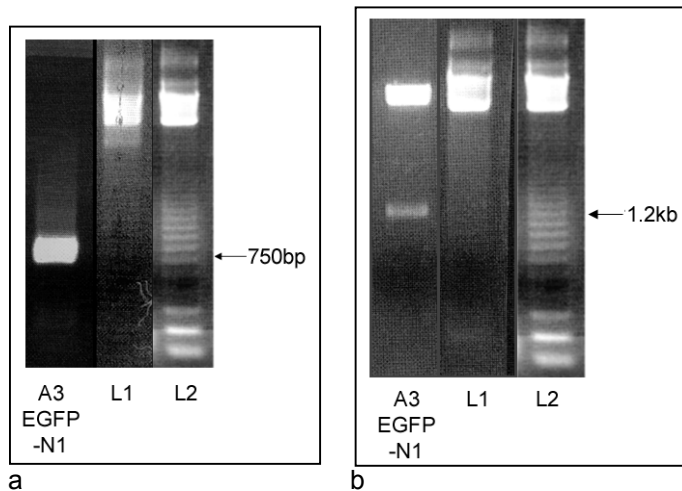


Abb.22: (a) Mit Hilfe des A3AdoR-spezifischen Primerpaares A3F1/R1 (siehe 4.7.6) konnte die gesamte A3AdoR-cDNS-Sequenz innerhalb des A3AdoRpEGFP-Konstruktes amplifiziert werden. (b) Restriktionsverdau des Konstruktes mit BamH I und Age I ergab das zu erwartende Restriktionsfragment von ca. 1.2kb Länge (A3EGFP-N1). Aufgrund der schlechten Sichtbarkeit der originalen Basenpaarleiter L1 wurde eine entsprechende zweite Leiter (L2) in das Bild einkopiert.

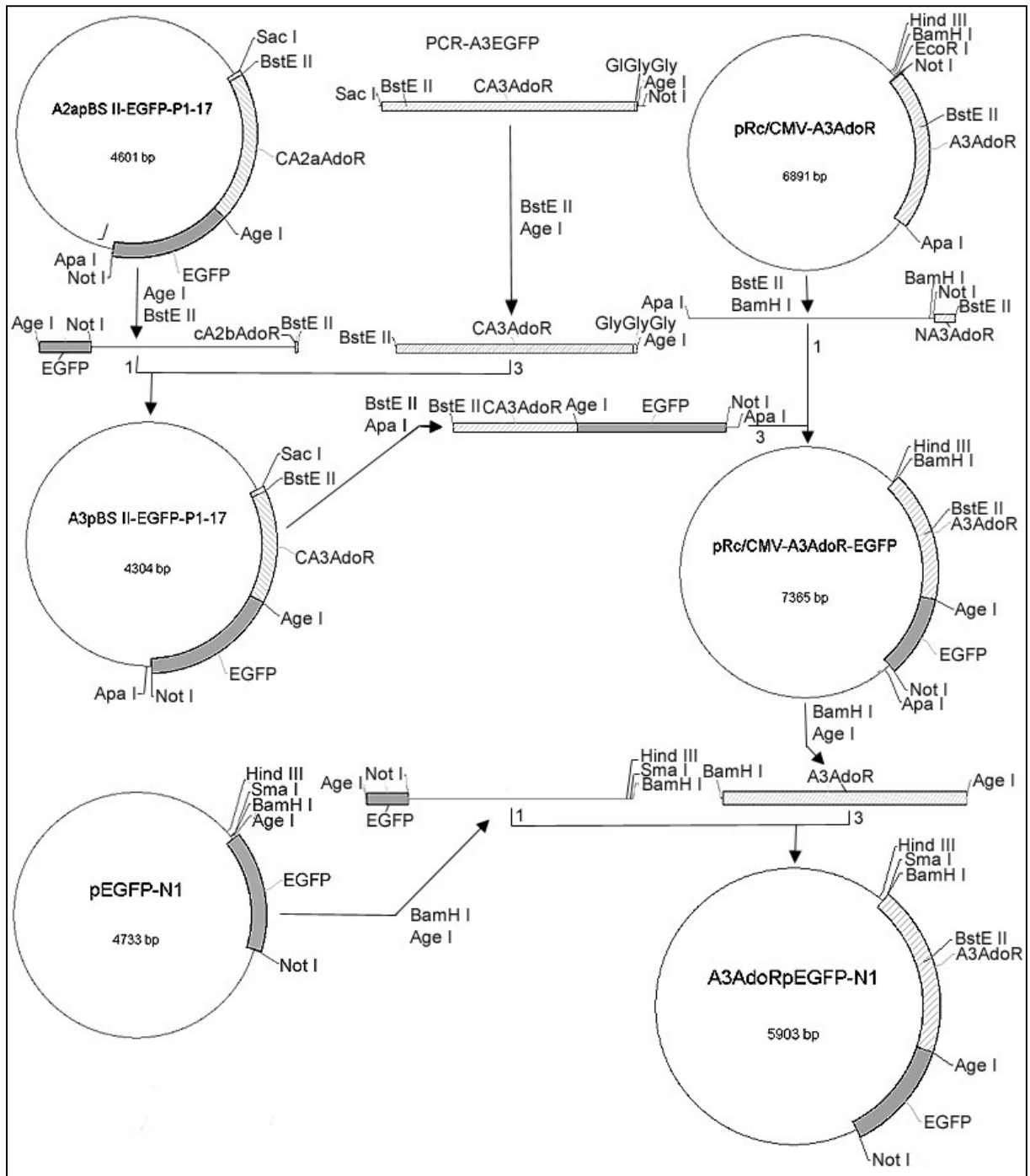


Abb. 23: Klonierungsschema des A3AdoRpEGFP-N1-Konstruktes.

Die Adaptersequenz des Fusionskonstruktes (PCR-A3EGFP) wurde über Austausch der CA2bAdoR-Gensequenz mittels BstE II/Age I in A2apBS II-EGFP-P1-17 einkloniert (A3pBS II-EGFP-P1-1). Ein vorläufiges Fusionskonstrukt (pRc/CMV-A3AdoR-EGFP) wurde in pRc/CMV-A3AdoR über Einbau der Adaptersequenz inklusive der EGFP-Sequenz (CA3AdoR+EGFP) über die BstE II- und Apa I-Schnittstellen generiert.

Das endgültige A3AdoRpEGFP-N1-Konstrukt erhielt man über die Ligation der modifizierten Gesamt-A3AdoR-Sequenz (A3AdoR mit BamH I/Age I aus pRc/CMV-A3AdoR-EGFP geschnitten) mit dem mit BamH I/Age I linearisierten pEGFP-N1-Vektor.

6.1.4 A1AdoRpEGFP-N1

6.1.4.1 Konstruktion des modifizierten C-Terminus

Wiederum wurde mit geeigneten Primern per PCR aus der C-terminal gelegenen A1AdoR-Sequenz ein geeigneter Fusionsadapter erzeugt, der über die BstE II/Age I-Schnittstellen in das bereits vorhandene pBS II-Konstrukt (A3pBS II-EGFP-P1-17) einkloniert und anschließend sequenziert wurde.

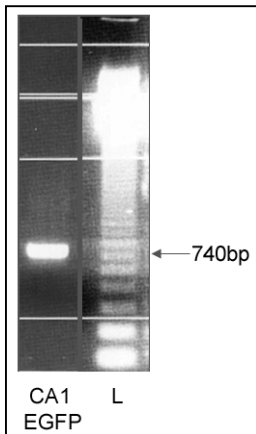


Abb. 24: „Colony-PCR“ des A1pBS II-EGFP- Zwischenkonstrukts. Die erfolgreiche Insertion des modifizierten A1AdoR C-Terminus (CA1EGFP) wurde mit den T3/GFPSeqR-Primern (siehe auch 4.7.1.2) über ein ca. 740 BP großes PCR-Amplifikat bestätigt.

6.1.4.2 Etablierung des A1AdoR-Fusions-Konstruktes in pEGFP-N1

Das A1AdoR-Fusions-Konstrukt erhielt man über eine 3-Komponenten-Ligation (3:3:1 molares Verhältnis) des N-Terminus des A1AdoR-Gens (pRc/CMV-A1AdoR (Hind III/BstE II)) mit dem modifizierten C-Terminus (A1pBS II-EGFP-P1-17 (BstE II/Age I)) in den Expressionsvektor pEGFP-N1 (linearisiert mit Hind III/Age I).

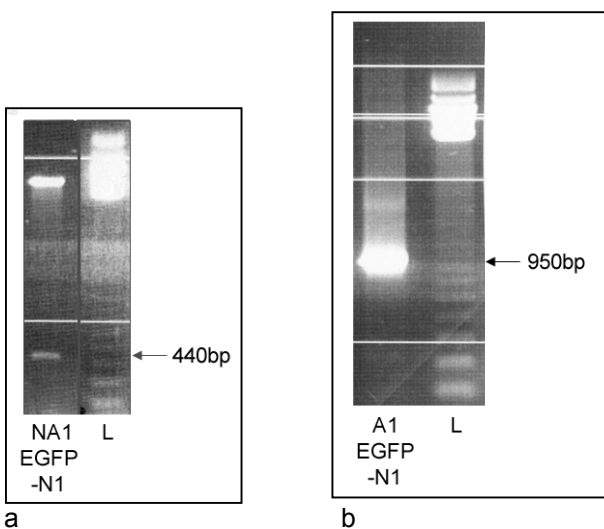


Abb. 25: a) Restriktionsverdau des A1AdoRpEGFP-N1-Konstruktes mit Hind III und BstE II ergab den einklonierten N-Terminus (NA1EGFP-N1) als Restriktionsfragment von ca. 440 BP Länge. (b) Mit Hilfe des A1AdoR-spezifischen Primerpaares A1F1/R1 (siehe 4.7.6) konnte die gesamte A1AdoR-cDNS-Sequenz innerhalb des A1AdoRpEGFP-Konstruktes mit einem ca. 950 BP langen Amplifikat nachgewiesen werden.

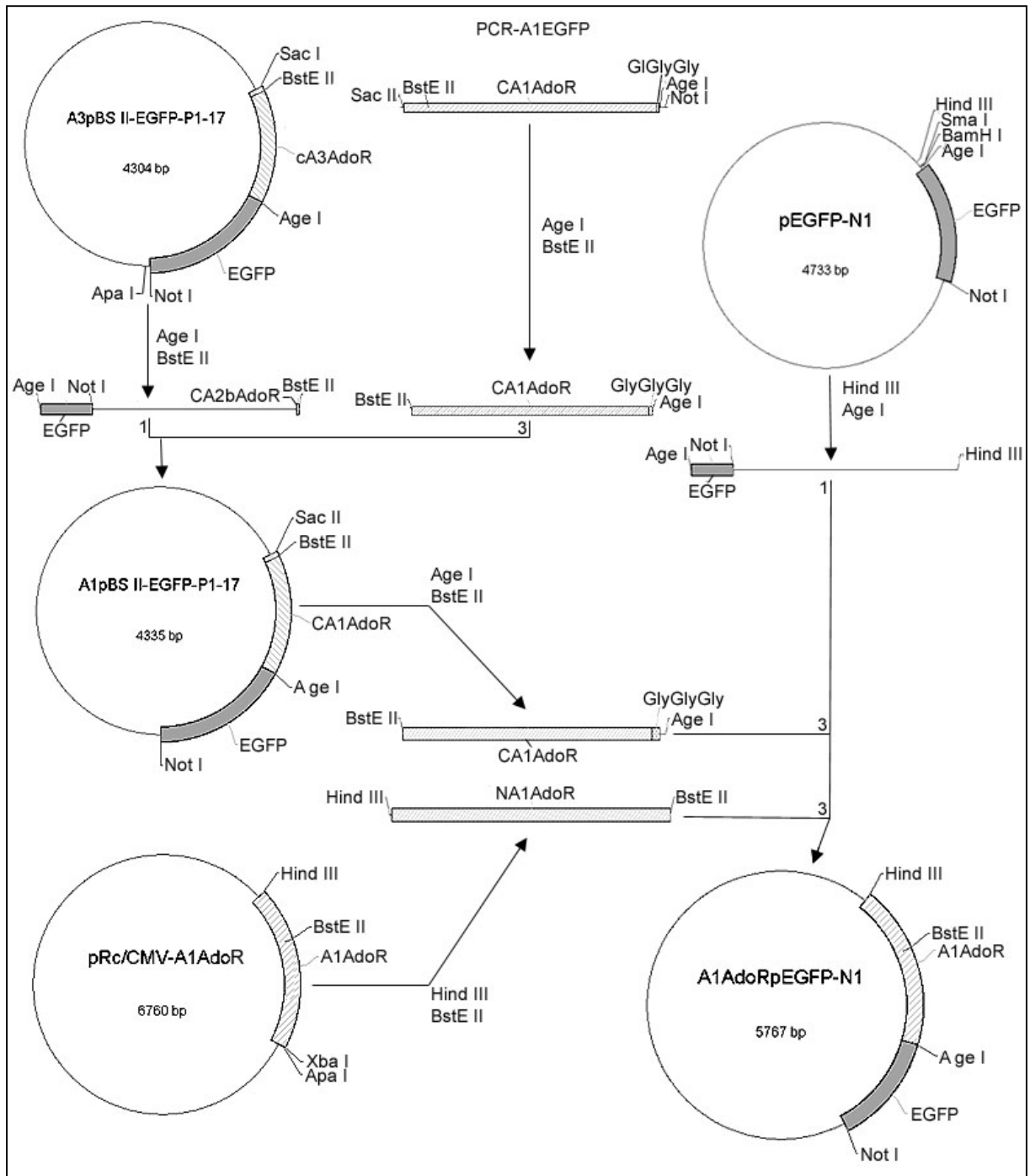


Abb. 26: Klonierungsschema des A1AdoRpEGFP-N1-Konstruktes.

Die Adaptersequenz des Fusionskonstruktes (PCR-A1EGFP) wurde über Austausch der CA3AdoR-Gensequenz über BstE II/Age I in A3pBS II-EGFP-P1-17 einkloniert (A1pBS II-EGFP-P1-1). Das endgültige Konstrukt erhielt man über eine 3-Komponenten-Ligation der Adaptersequenz (CA1AdoR mit BstE II/Age I aus A1pBS II-EGFP-P1-17 geschnitten) und des N-Terminus des A1AdoR-Gens (NA1AdoR aus pRc/CMV-A1AdoR über Hind III/BstE II-Verdau) mit dem mit Hind III/Age I linearisierten pEGFP-N1-Vektor.

6.2 Etablierung stabiler Zelllinien

Zur weiteren Untersuchung der Adenosinrezeptor-Respons in verschiedenen Modellsystemen wurde mit den Transfektionsreagenzien Fugene und Effectene die verschiedenen Adenosinrezeptor-Subtypen in CHO- (Chinese Hamster Ovary; A1CHO; A3CHO) und HeLa-Linien (Cervix-Carcinom; A1HeLa bis A3HeLa) transfiziert und mit Hilfe des EGFP-Anhangs auf stabile Transfektanten selektiert.

6.2.1 HeLa-Transfektanten

6.2.1.1 Nachweis mittels des EGFP-Anhangs

Vortests mit pEGFP-N1-Transfektanten ergaben mit dem Effectene-Reagenz eine optimale DNS-Menge von 0.8 µg und eine optimale Konzentration von 500 µg/ml an Geneticin im Selektionsmedium. Die Effizienz der Transfektion lag bei ca. 50% für pEGFP-N1, jedoch nur durchschnittlich bei ca. 10% für die verschiedenen Expressionskonstrukte. Stabile Transfektanten wurden vereinzelt und für ca. 3 Wochen selektiert.

Für alle 4 Fusionskonstrukte konnten stabile Transfektanten erhalten werden, deren Fluoreszenzverteilung bei 488 nm auf eine hauptsächlich membranorientierte Expression der Konstrukte hindeutet (siehe Abb. 28), was auf eine erfolgreiche Prozessierung und den Transport der Rezeptorkonstrukte in die Zellmembran zurück schließen läßt.

6.2.1.2 Ergebnisse der RT-PCR

RNS-Isolate aus den einzelnen Transfektanten wurden mit Hilfe der RT-PCR auf die cDNS des EGFP-Anhangs erfolgreich untersucht. Der Nachweis der cDNS-Niveaus der jeweiligen AdoR-Subtypen in den jeweiligen Transfektanten erfolgte im Rahmen der Experimente zur semiquantitativen RT-PCR (siehe 6.4.1).

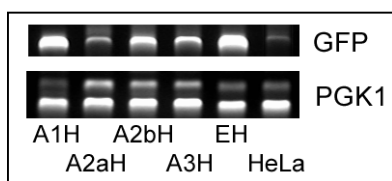


Abb. 27: Nachweis der EGFP-cDNS in den 4 Transfektanten A1HeLa bis A3HeLa (A1H bis A3H) und EGFP HeLa (EH). Im Falle der A1AdoR-/A2bAdoR- und A3AdoR-Konstrukt-Transfektanten findet man ein starkes Signal des EGFP-cDNS-Anhangs, während man bei dem A2aAdoR-Konstrukt-Transfektanten ein etwas schwächeres Signal fand. Als Mengenkontrolle diente das cDNS-Niveau des „Housekeeping“-Gens Phosphoglycerat-Kinase 1 (PGK1), wobei das Verhältnis der Produktbande (untere Reihe) zur Kompetitorbande (obere Reihe) ausschlaggebend war.

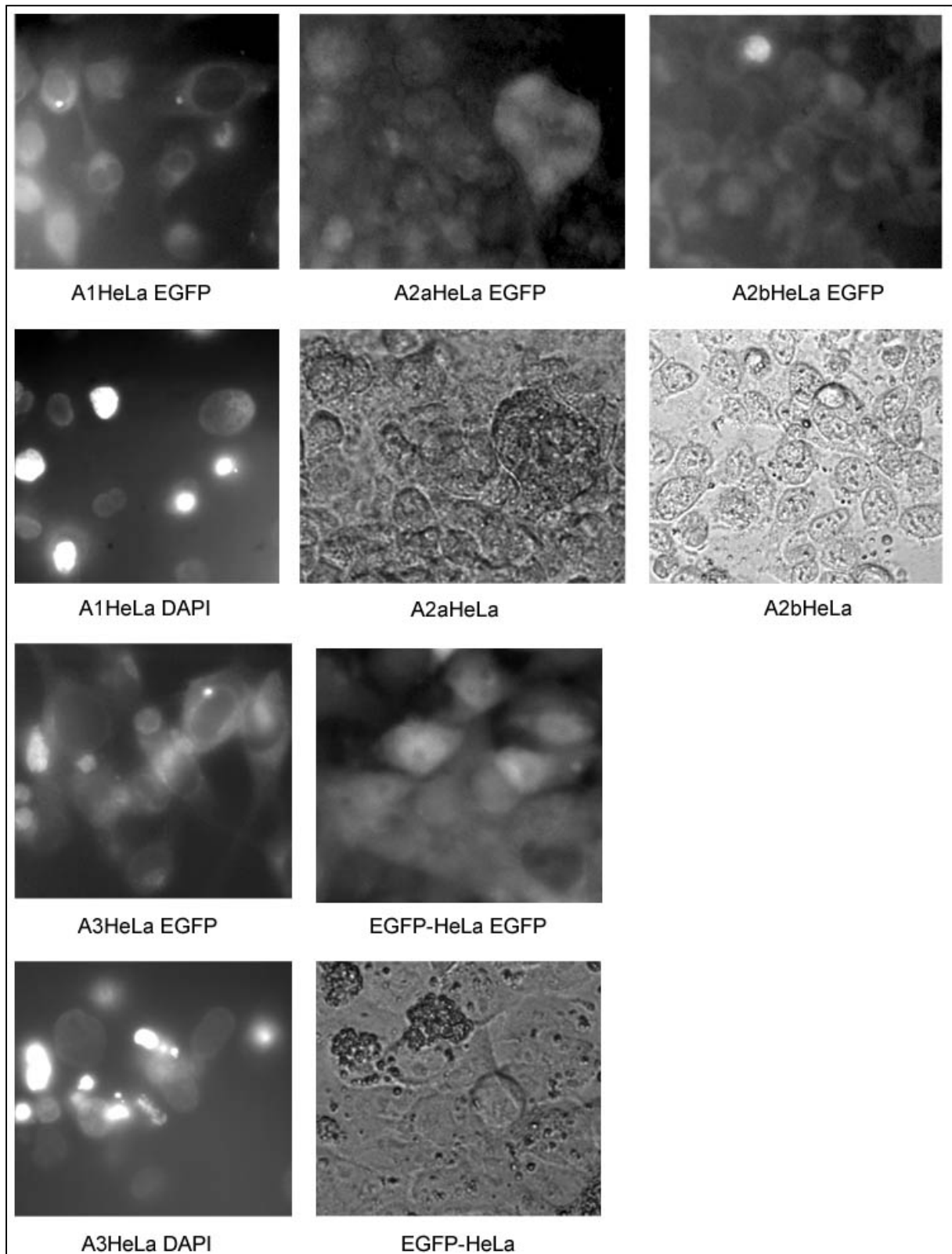


Abb. 28: Stabile Fusionskonstrukt-Transfektanten in der HeLa-Zelllinie.

In den meisten Fällen erkennt man eine deutliche Expression der verschiedenen EGFP-Fusionsprotein-Konstrukte (A1HeLa EGFP bis A3HeLa EGFP) und eine -im Vergleich zur reinen EGFP-Kontroll-Transfektanten (EGFP-HeLa EGFP)- Lokalisation der Fluoreszenz im Membranbereich, was auf einen funktionellen Transport der prozessierten Fusionskonstrukte in die Membran hindeutet. Die Lokalisation der Zellen im Vergleich zur EGFP-Fluoreszenz erfolgte über lichtmikroskopische Aufnahmen (EGFP-HeLa; A2aHeLa; A2bHeLa) oder über Anfärbung des Zellkernes mit DAPI (A1HeLa DAPI; A3HeLa DAPI).

6.2.2 CHO-Transfektanten

Die nicht humane Zelllinie CHO („Chinese hamster ovary“) erwies sich insbesondere deshalb als sehr nützlich, da diese Linie keine Adenosinrezeptoren exprimiert (Klotz *et al.* 1998).

6.2.2.1. Nachweis des EGFP-Anhangs

Die besten Ergebnisse wurden mit dem Transfektionsreagenz Fugene mit 3 µg DNS pro Transfektionsansatz und einer Geneticin-Konzentration von 600 µg/ml im Selektionsmedium erzielt. Die Transfektionseffizienz lag bei 80% im Falle der pEGFP-N1-Transfektante und bei 5 bis 20% im Falle der jeweiligen Fusionskonstrukte. Wiederum wurden positive Klone vereinzelt und für mindestens 3 Wochen selektiert.

Es konnten jedoch nur stabile Transfektanten der inhibitorischen AdoR-Subtypen (A1AdoR; A3AdoR) mit hohen Expressionsniveaus gezogen werden (Abb. 29), wogegen eine erhöhte Lethalität in Linien beobachtet wurde, die mit den excitatorischen Rezeptor-Subtypen (A2aAdoR/A2bAdoR) transfiziert waren. Wiederum erkennt man in der Fluoreszenzverteilung der stabilen Transfektanten eine membranorientierte Expression des jeweiligen Fusionskonstruktes.

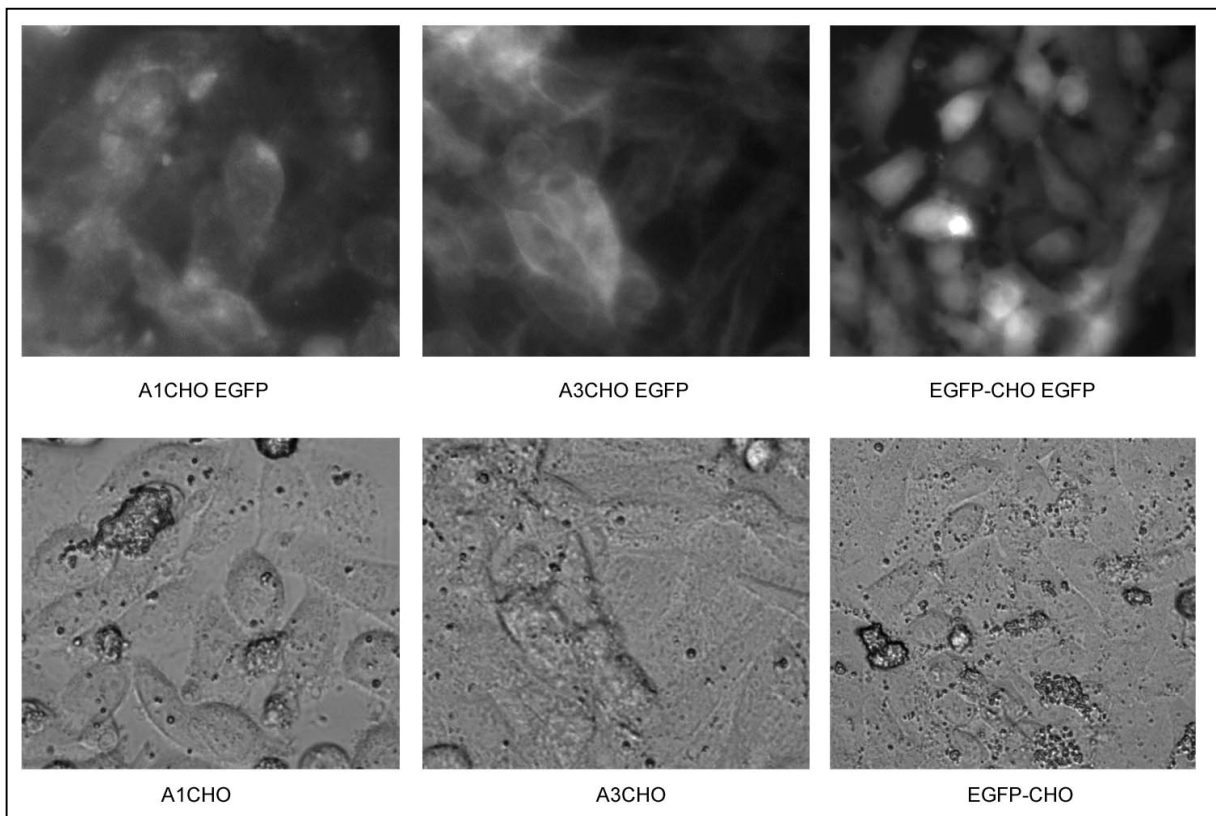


Abb. 29: Stabile Fusionskonstrukt-Transfektanten in der CHO-Zelllinie.

In beiden Fällen erkennt man eine deutliche Expression der EGFP-Fusionsprotein-Konstrukte (A1CHO EGFP und A3CHO EGFP) und eine –wiederum im Vergleich zur EGFP-Kontroll-Transfektanten (EGFP-CHO EGFP)- Lokalisation der Fluoreszenz im Membranbereich, was auf einen funktionellen Transport der prozessierten Fusionskonstrukte in die Membran hindeutet. Die Lokalisation der Zellen im Vergleich zur EGFP-Fluoreszenz erfolgte über lichtmikroskopische Aufnahmen (A1CHO; A3CHO; EGFP-CHO).

6.2.2.2 Ergebnisse der RT-PCR

Im Falle der CHO-Transfektanten konnte in den jeweiligen RNS-Isolaten mit Hilfe der RT-PCR die cDNS sowohl des EGFP-Anhangs, als auch mit den sequenzspezifischen Primerpaaren die jeweiligen cDNS-Abschnitte der AdoR-Sequenzen erfolgreich nachgewiesen werden (zum Nachweis der sequenzspezifischen Abschnitte siehe auch 6.3.3.1; Abb. 36. Template für die A1AdoR- und A3AdoR-Kinetiken waren mRNS-Isolate der entsprechenden CHO-Klone).

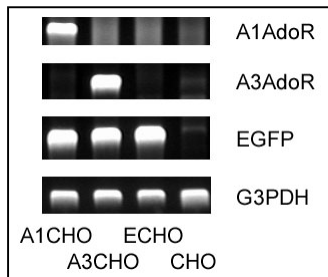


Abb. 30: Nachweis der Konstrukt-spezifischen cDNS der Transfektanten in der CHO-Zelllinie. Alle 3 Transfektanten (A1CHO/A3CHO und ECHO) waren positiv auf die mRNS des EGFP-Anhangs, die untransfizierte Kontrolle CHO jedoch nicht. Lediglich die jeweiligen Transfektanten zeigten ein Amplifikat mit den jeweiligen AdoR-sequenzspezifischen Primern. Als Mengenkontrolle diente das Amplifikat der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (G3PDH).

6.2.2.3 Nachweis der Funktionalität des A1AdoR-EGFP-Konstruktes in CHO über Stimulus-abhängige Internalisierungsmechanismen.

Schon seit längerem ist bekannt, daß der inhibitorische A1AdoR durch Stimulierung mit seinem Agonisten R-PIA eine Desensibilisierung und anschließende Internalisierung erfährt und hiermit seine Respons reguliert wird. Hierbei kommt es zunächst zu einer Konzentration der Rezeptorproteine an mehreren Stellen der Membran, dem eine allmähliche Endozytose folgt (Saura *et al.* 98).

Im Falle einer funktionellen Expression des A1AdoR-Fusionskonstruktes in der CHO-Zelllinie, sollte ebenfalls nach Stimulierung mit R-PIA eine derartige lokale Konzentration und Internalisierung des Rezeptors zu beobachten sein.

A1CHO-Transfektanten wurden auf Objektträgern angezogen und für 5 Minuten, 20 Minuten, 3 Stunden und einen Tag mit 50 nM R-PIA inkubiert, anschließend fixiert und die Verteilung des Rezeptors anhand der Fluoreszenzverteilung des EGFP-Anhangs bestimmt.

Bereits nach 20 Minuten erkannte man eine leichte Konzentration der Fluoreszenz an mehreren Punkten, die bereits nach 3h zu einem deutlichen Fleckenmuster auf der Zellmembran führte (Abb. 31). Nach einem Tag konnte man eine deutliche Internalisierung der Fluoreszenzverteilung bzw. eine Konzentration der Fluoreszenz in der Nähe des Zellkerns erkennen (siehe auch Abb. 32).

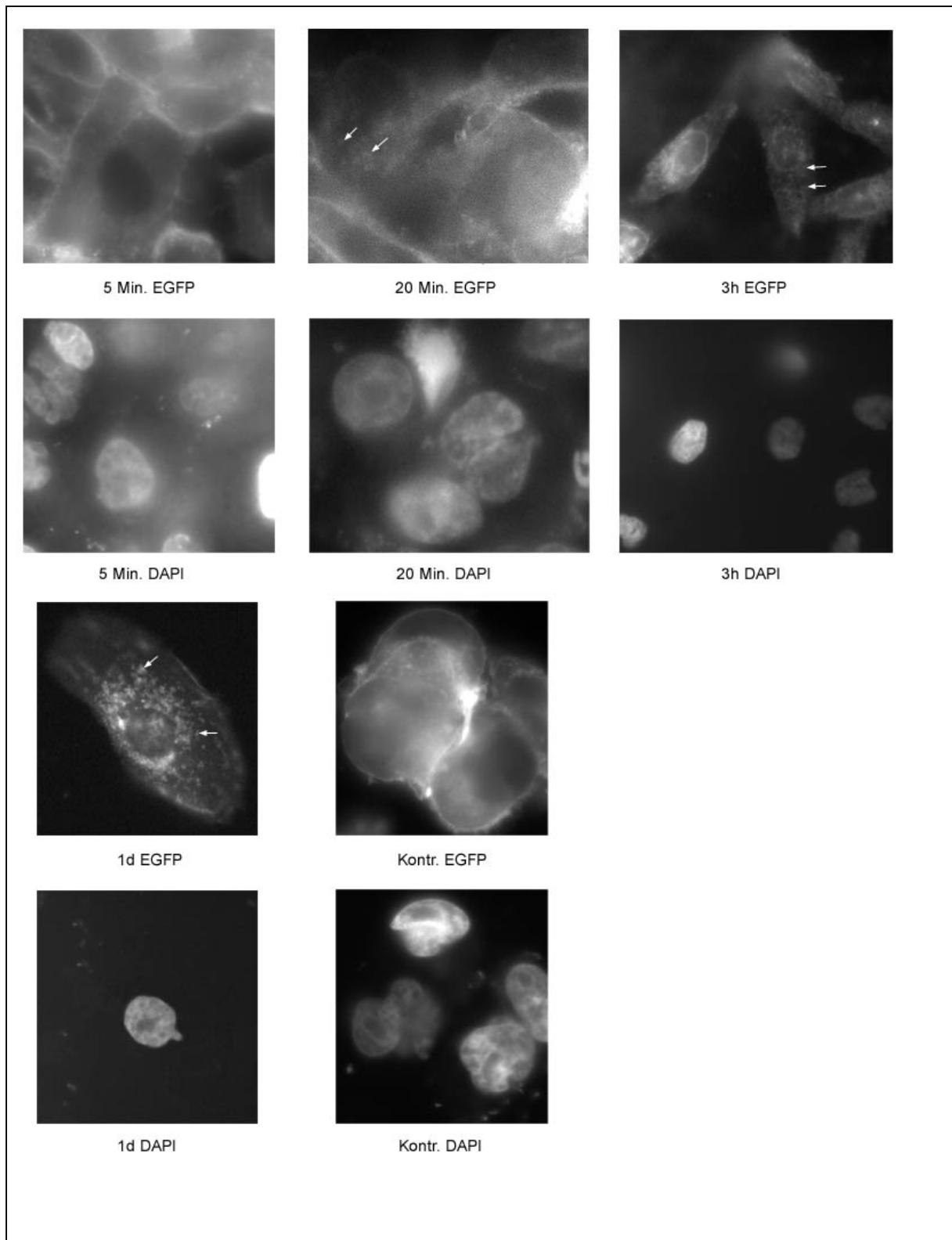


Abb. 31: Internalisierung des A1AdoR-Konstruktes in der A1CHO-Zelllinie nach Induktion mit R-PIA. Die Zellen wurden für 5min.; 20min.; 3h und 1 Tag (d) mit 50 nM R-PIA stimuliert und fixiert. Aufgrund der relativ abgeflachten Form der A1CHO-Klone wurde mit Hilfe der DAPI-Färbung auf die Mitte des Zellkerns fokussiert, um auch Einblick über die Fluoreszenzverteilung innerhalb des Zelllumens zu gewinnen. Findet man bei der unstimulierten Kontrolle (Kontr.) und nach 5-minütiger Stimulierung eine noch homogene Verteilung der Fluoreszenz an der Membranoberfläche, so erkennt man schon nach 20-minütiger Stimulierung eine leichte Ausbildung von Fluoreszenzfoci (siehe Pfeile), die nach 3h sehr deutlich zu erkennen ist. Nach einem Tag erkennt man eine Konzentrierung dieser Foci in der Umgebung des Zellkerns, was auf eine Internalisierung des Konstruktes hindeutet.

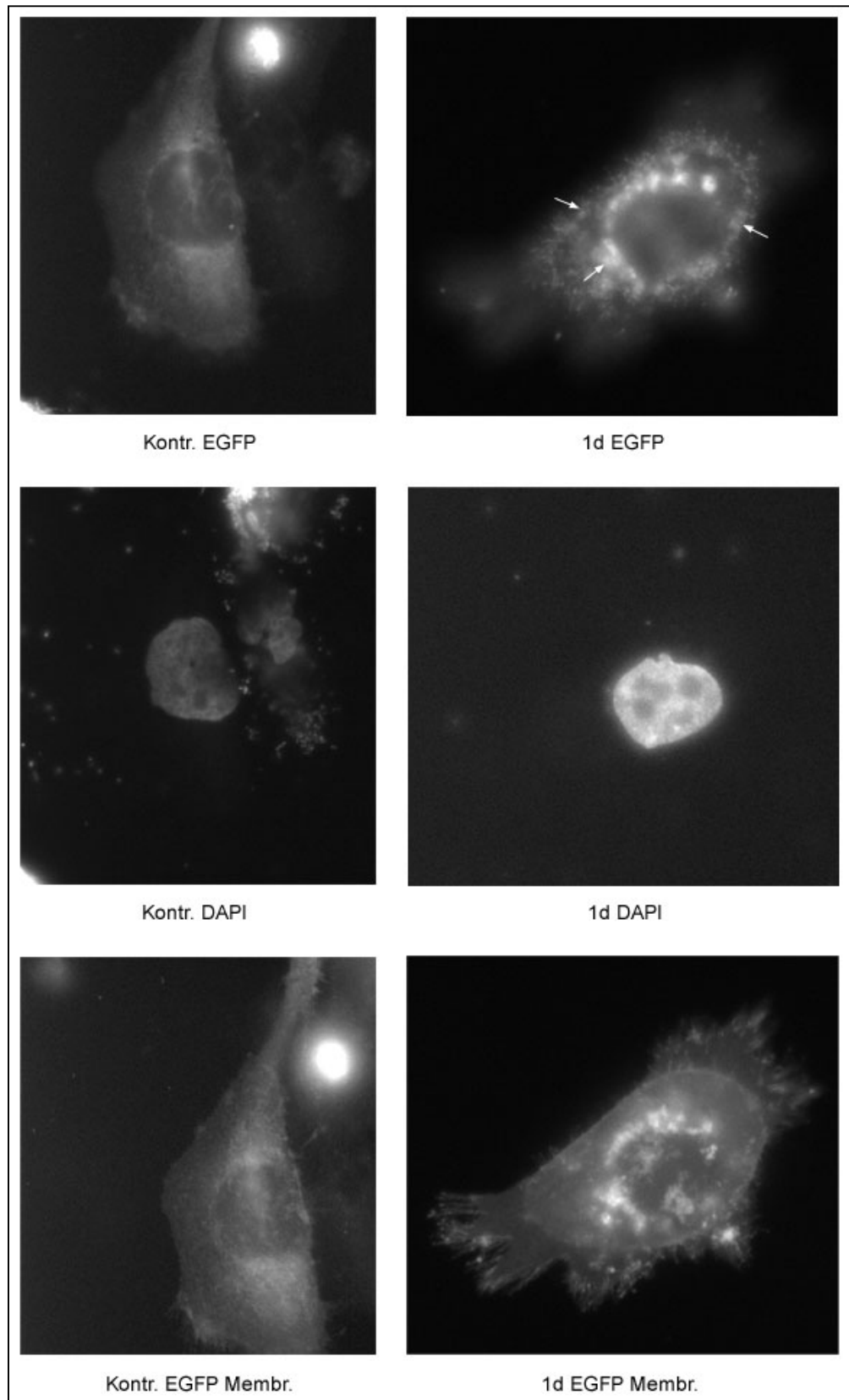


Abb. 32: Eine deutliche Internalisierung der Fluoreszenzfoci in das Zelllumen konnte nach Stimulierung über einen Tag (1d) beobachtet werden. Hierfür wurde wiederum zunächst auf den Zellkern fokussiert (DAPI). Im Gegensatz zur unstimulierten Kontrolle erkennt man eine deutliche Konzentrierung der Fluoreszenzfoci in der Umgebung des Zellkerns. Daß sich diese Foci innerhalb des Zelllumens befanden, konnte man an der abweichenden Fluoreszenzverteilung an der Zelloberfläche erkennen (EGFP Membr.).

6.3 Etablierung der Semiquantitativen RT-PCR

Zur Bestimmung des mRNS-Gehalts eines zu untersuchenden Gens aus den RNS-Isolaten wurde neben Northern-Blot-Analyse der Proben hauptsächlich die sogenannte RT-PCR eingesetzt. Hierbei wurde mit Hilfe viraler reverser Transkriptasen (AMV) der gesamte mRNS-Pool in komplementäre DNS (cDNS) umgeschrieben und die erhaltene cDNS-Bibliothek mit sequenzspezifischen Primern per „Polymerase chain reaction“ (PCR) auf das Vorhandensein der subtypspezifischen AdoR-cDNS untersucht.

In der semiquantitativen RT-PCR ermöglicht der Einsatz eines zusätzlichen heterologen Standards (Kompetitor) eine semiquantitative Abschätzung der relativen cDNS-Menge. Hierbei konkurrieren die zu untersuchenden cDNS-Transkripte mit einer genau definierten Menge des Kompetitors um die Primer, so daß aus dem Verhältnis der beiden Produktbanden (der Kompetitor wurde so gewählt, so daß sich sein PCR-Produkt um ca. 50% von der Länge der entsprechenden AdoR-cDNS unterscheidet), auf die relative Menge (im Bezug auf den Kompetitor) der AdoR-cDNS zurückgeschlossen werden kann.

Um eine solche Aussage treffen zu können müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

1. Die sequenzspezifischen Primer dürfen keine Produkte mit chromosomaler DNS ergeben. Aus diesem Grund wurden die Primer so gewählt, daß sie ein Intron des jeweiligen AdoR-Gens überspannen.
2. Es dürfen keine großen kinetischen Effekte bei der Koamplifikation des Kompetitors auftreten. Um eine gute semiquantitative Aussage zu ermöglichen, muß also die Amplifikation der Kompetitor-Bande in etwa mit der Amplifikation der Produktbande einhergehen.
3. Die eingesetzte cDNS-Menge muß in allen verglichenen Proben gleich sein. Hierfür wurde als Mengenstandard, das bereits etablierte PGK1- System (Phosphoglycerat-Kinase 1) verwendet, das jeweils als paralleler Kontrollansatz mit untersucht wurde. Sämtliche Ergebnisse wurden daraufhin mit diesen Werten abgeglichen.

6.3.1 Etablierung des heterologen Standards

Als DNS-Matrize für die Kompetitoren wurden zwei pBS II SK (-)-Konstrukte verwendet, deren Amplifikation mit „Multiple Cloning Site“ (MCS) flankierenden Primern ein Produkt von 300 BP bzw. 500 BP ergaben. Die Primer wurden für den jeweiligen Kompetitor aus am 3'-Ende gelegenen pBS II-homologen Sequenzen und am 5'-Ende gelegenen -den jeweiligen AdoR-Primern homologen- Sequenzen zusammengesetzt (siehe Abb. 33).

Nach Zwischenaufreinigung des Produktes folgte ein weiterer Amplifikationsschritt mit den sequenzspezifischen AdoR-Primern und eine Einstellung des gereinigten Produktes auf eine Ausgangskonzentration von 100 attomol/ μ l (10^{-18} mol/ μ l).

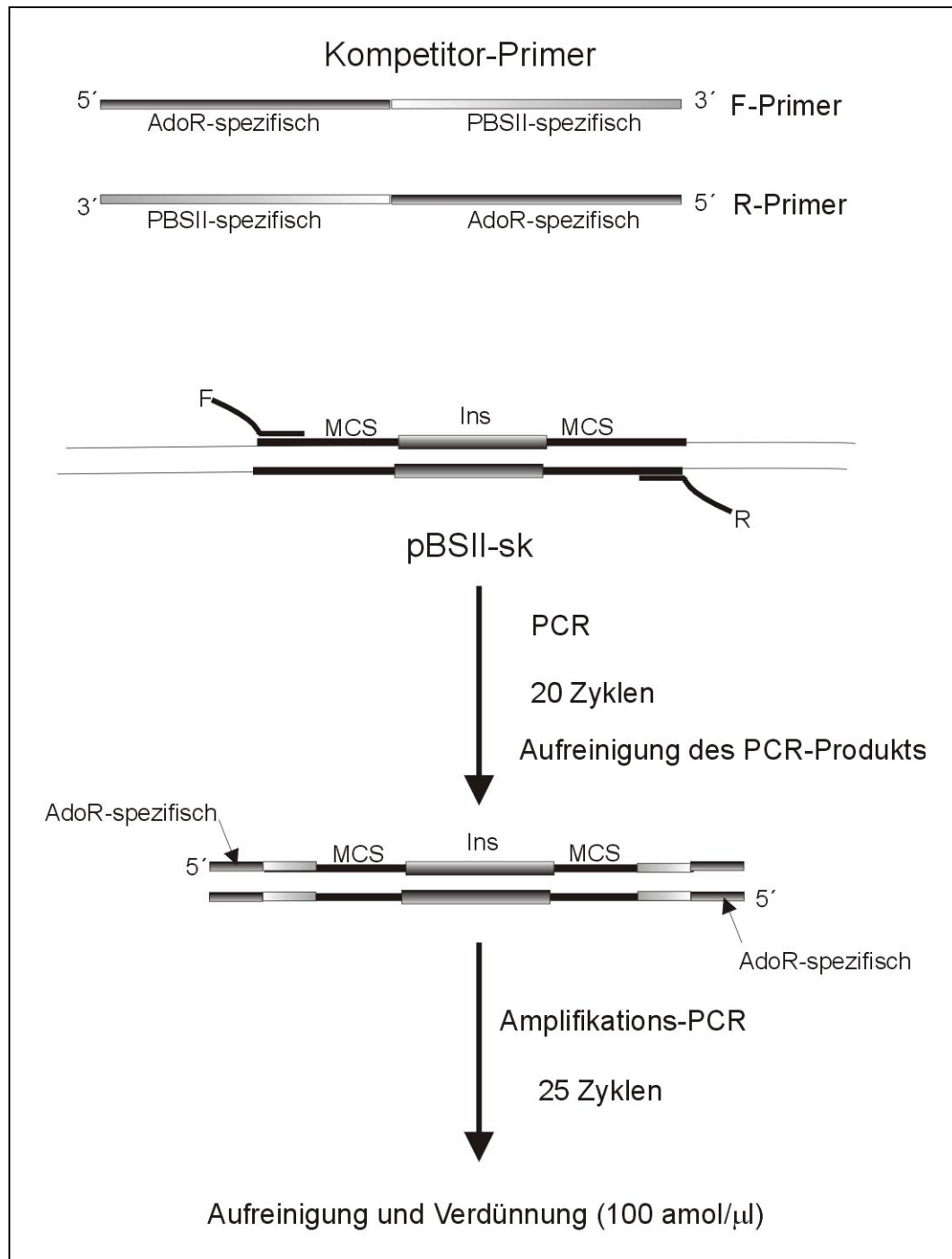


Abb. 33: Darstellungsschema des Kompetitors.

Kompetitor-Primer wurden so entworfen, daß an den 5'-Enden jeweils zu den AdoR-sequenzspezifischen Primern homologe Abschnitte lagen, an die innenliegend pBS IISK (-)-homologe Sequenzabschnitte zur Amplifikation aus pBS II SK (-) anschlossen. Nach einer ersten PCR-Amplifikation mit diesen Kompetitor-Primern wurde das Produkt aufgereinigt und in einer anschließenden PCR mit den jeweiligen AdoR-sequenzspezifischen weiteramplifiziert, aufgereinigt und auf 100 amol/μl eingestellt.

Mit Hilfe von Verdünnungsreihen wurde jeweils die optimale Meß-Konzentration der einzelnen Kompetitoren ermittelt.

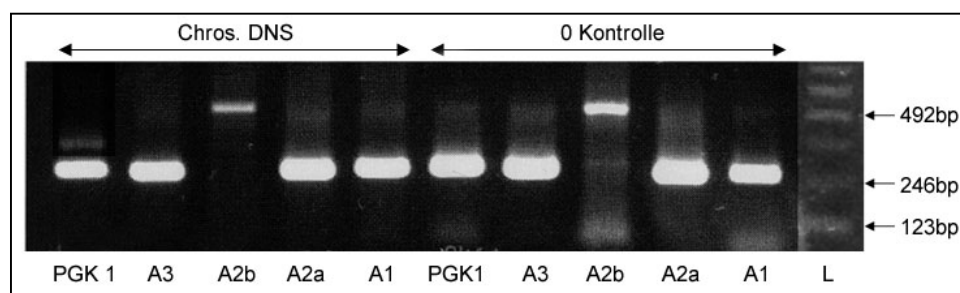
Kompetitor	Ausgangs-Konz.
A1AdoR	2.5×10^{-3} amol/ μ l
A2aAdoR	1.0×10^{-2} amol/ μ l
A2bAdoR	2.5 amol/ μ l
A3AdoR	5×10^{-2} amol/ μ l

Tab. 8: Verwendete Ausgangskonzentration der jeweiligen AdoR-subtypspezifischen Kompetitoren. Jeweils eine 1:30 Verdünnung dieser Ausgangskonzentration entsprach den Reaktionsbedingungen.

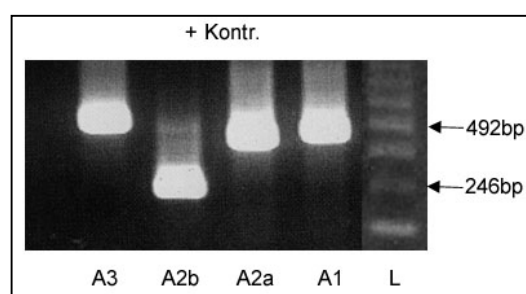
6.3.2 Nachweis der Spezifität der jeweiligen semiquantitativen RT-PCR-Systeme

6.3.2.1 Spezifität zur cDNS

In keiner der untersuchten RT-PCR-Systemen konnte ein nennenswertes Signal mit chromosomaler DNS erhalten werden. Zudem konnten keine Signale in der cDNS-Bibliothek der CHO-Zelllinie beobachtet werden (siehe auch 6.2.2.2)



a



b

Abb. 34 a/b: Nachweis der Spezifität zur cDNS der AdoR-Subtypen.

Kontrollansätze ohne Substrat (0 Kontrolle), wie auch mit 100 ng chromosomaler DNS (Chros. DNS) ergaben nur Amplifikate der jeweiligen Kompetitoren (A1AdoR, A2aAdoR, A3AdoR und PGK1 mit jeweils 300 BP, A2bAdoR 500 BP). Für die Positiv-Kontrolle (+ Kontr.) wurden 50 ng der jeweiligen pEGFP-Fusionskonstrukte als Substrat eingesetzt.

6.3.2.2 Spezifität zum jeweiligen AdoR-Subtyp

Restriktionsverdaus der PCR-Amplifikate an - für die jeweiligen amplifizierten Sequenzabschnitte spezifischen - Schnittstellen ergab die erwarteten Fragmente und bestätigte damit eine AdoR-Subtyp-spezifische Amplifikation innerhalb des jeweiligen RT-PCR-Systems (Tab. 9 und Abb. 35).

AdoR-Subtyp	Kompetitor-Produkt	cDNS-Produkt	Fragmente des cDNS-Produktes	Restriktions-Endonuklease
A1AdoR	300bp	500bp	211bp/289bp	BstE II
A2aAdoR	300bp	484bp	158bp/326bp	BstE II
A2bAdoR	500bp	278bp	81bp/197bp	Sac I
A3AdoR	300bp	570bp	240bp/330bp	BstE II

Tab. 9: Übersicht über die zu erwartenden PCR-Produkt-Banden und ihre Restriktionsfragmente.

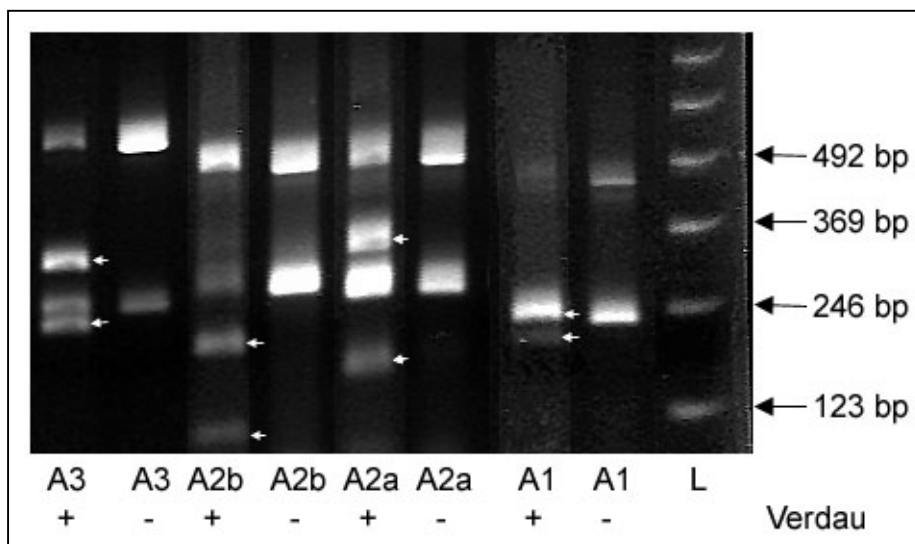


Abb. 35: Restriktionsverdau der PCR-Amplifikate.

Relevante Fragmente wurden mit Pfeilen gekennzeichnet. Als Negativ-Kontrolle (-) wurden die unverdauten PCR-Amplifikate verwendet.

6.3.3 Empfindlichkeit der semiquantitativen RT-PCR

6.3.3.1 Kinetik der Amplifikation der jeweiligen RT-PCR-Systeme

In großem und ganzen konnte bei allen 4 Systemen eine relativ gleichmäßige Koamplifikation der Kompetitorbande mit der Produktbande festgestellt werden (Abb. 36/37).

Berücksichtigt man, daß alle RT-PCR's unter gleichen Reaktionsbedingungen (was die jeweilige Zyklenanzahl und Temperaturprofile angeht) abliefen, konnte man wohl kinetische Effekte bei der Auswertung unberücksichtigt lassen.

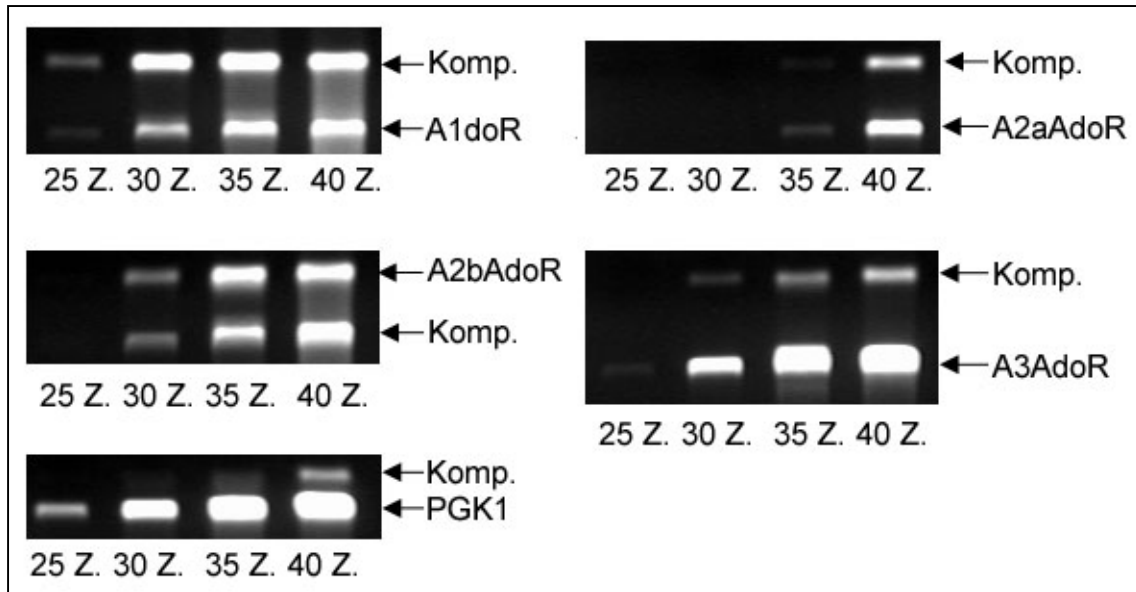


Abb. 36: Koamplifikation der Produkt- und Kompetitorbanden in den jeweiligen RT-PCR-Systemen. Ab dem 25. Reaktionszyklus wurden nach jeweils 5 Zyklen ein Probenansatz entnommen und abschließend miteinander verglichen.

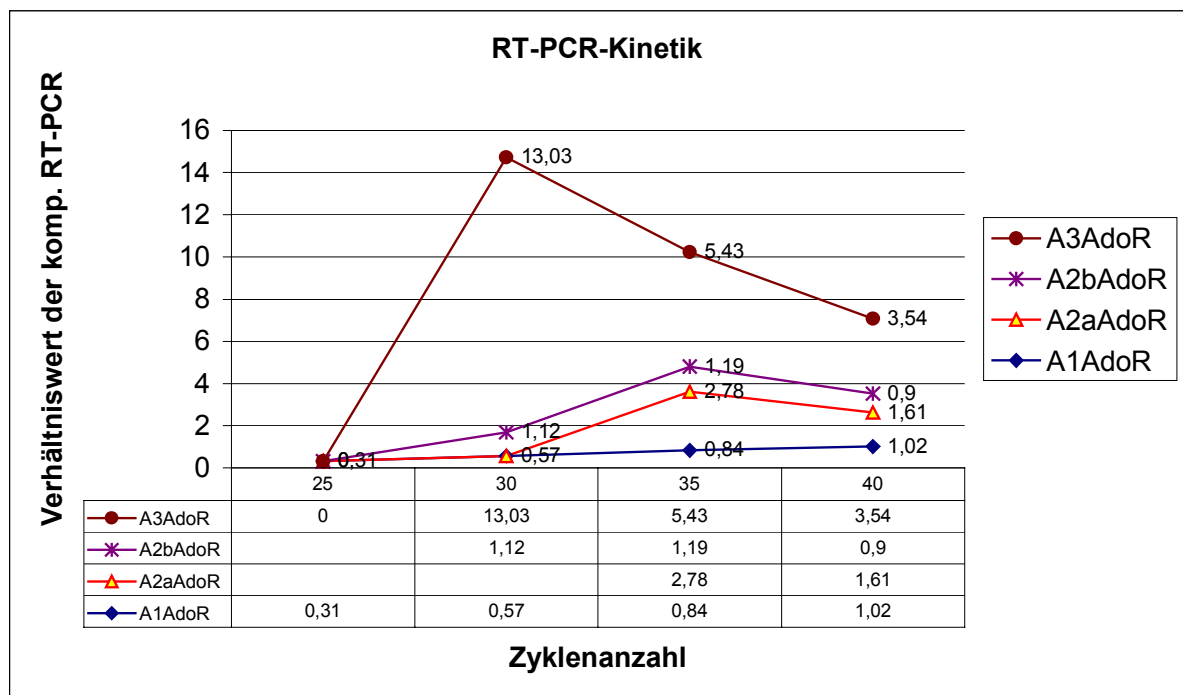


Abb. 37: Auswertung der RT-PCR-Kinetik. Aufgetragen sind die Quotienten der densitometrischen Auswertung der Produktbanden zu den jeweiligen Kompetitorbanden.

6.3.3.2 Konzentrationsreihen

Um abschätzen zu können, ob die Signalverhältnisse auch den wirklichen Mengenverhältnissen entsprechen, wurden Konzentrationsreihen mit variierenden Substratmengen angelegt (Abb. 38). Gegenüber üblichen Mengenabschätzungen (wie z.B. G3PDH) ist eine deutlich bessere Auflösung in der semiquant. RT-PCR zu erkennen (G3PDH kein Unterschied des Signals zwischen 300 ng bis 100 ng eingesetzter cDNS-Menge - einem Mengenunterschied von 3:1 - gegenüber einem deutlichen Signalunterschied oftmals schon bei 50 ng und 30 ng eingesetzter cDNS in den semiquantitativen Systemen). Im Falle der G3PDH-Bestimmungen scheint man aber unter diesen Bedingungen bereits im Sättigungsbereich gewesen zu sein. Jedoch entspricht in den etablierten Systemen die Verhältnisse der Signalstärke nicht unbedingt den wirklichen Mengenverhältnissen (siehe Abb. 39), so daß man keine Aussage über die absoluten Verhältnisse machen sollte, sondern die Ergebnisse eher auf der Basis eines qualitativen Vergleichs behandeln sollte. Aus diesem Grund wurden auch keine absoluten Vergleiche zwischen den verschiedenen Subtypen untersucht und alle Angaben wurden auf der Basis relativer Werte gemacht.

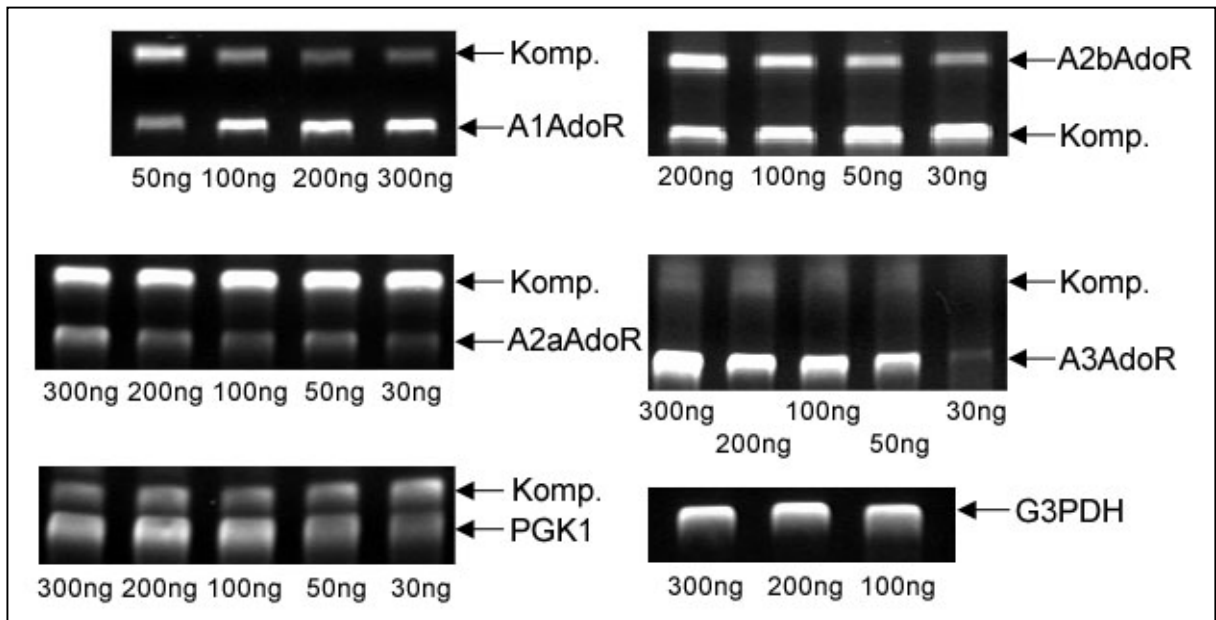


Abb. 38: Konzentrationsreihen der verschiedenen semiquantitativen RT-PCR-Systeme (A1AdoR bis PGK1). Mengenangaben entsprechen der Äquivalenzmenge der in die RT ursprünglich eingesetzten Gesamt-RNS.

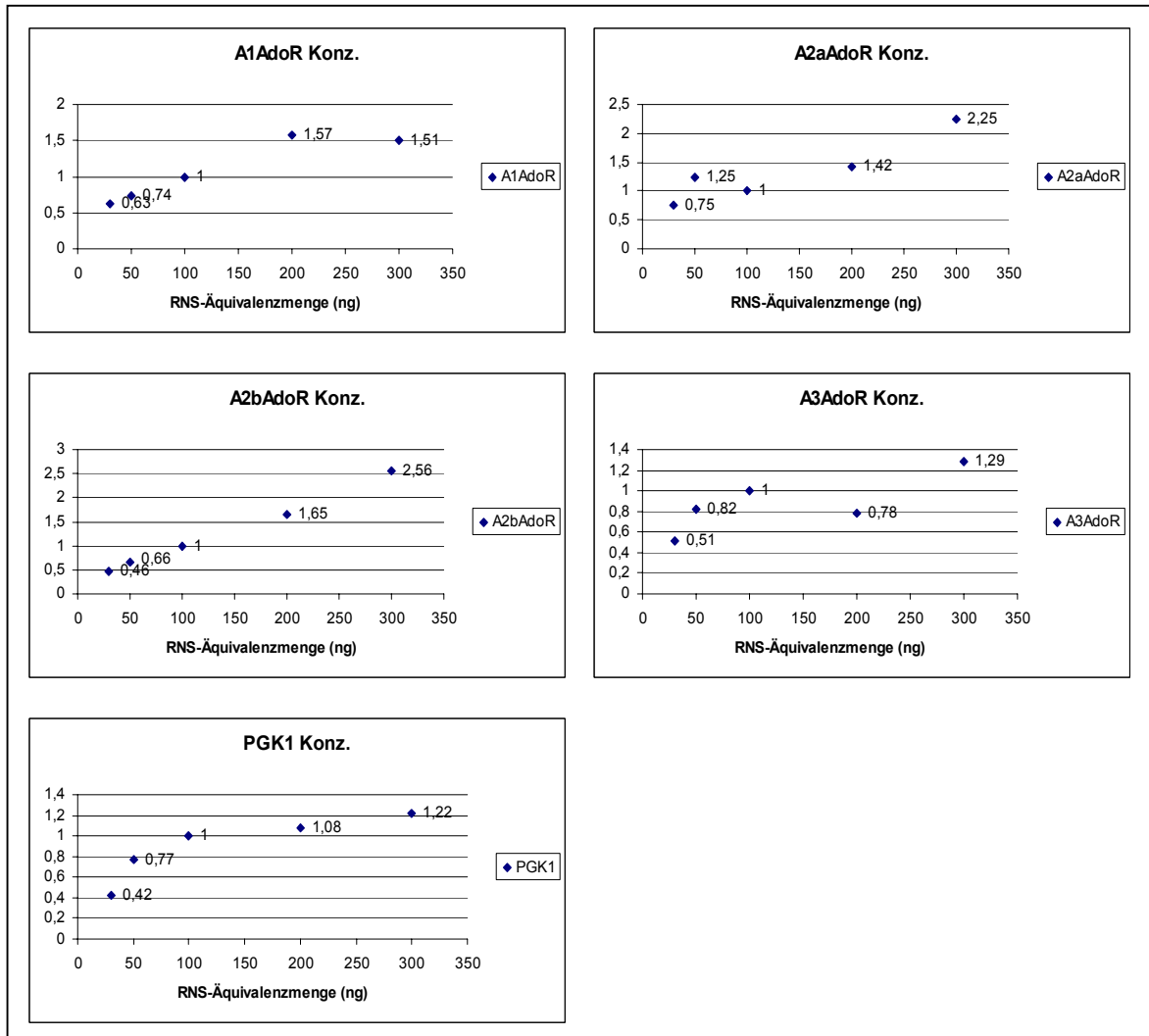


Abb. 39: Auswertung der Konzentrationsreihen

Aufgetragen sind die relativen Quotienten der densitometrischen Auswertung der Produktbanden zu den jeweiligen Kompetitorbanden in Bezug auf eingesetzter Gesamt-RNS-Äquivalenzmenge. Zur Normierung (Ausnahme G3PDH) diente der jeweilige Wert des Reaktionsansatzes mit 100 ng RNS-Äquivalenzmenge als eingesetztes Substrat.

6.4 Untersuchungen in den HeLa-Transfektanten

6.4.1 cDNS-Niveaus der HeLa-Transfektanten

HeLa-Zelllinien zeigen von Natur aus eine hohe Expression des A2bAdoR-Subtypes, gefolgt vom A1AdoR-Subtyp und relativ geringen Expressionsniveaus der A2a-/A3AdoR-Subtypen (siehe auch Tab. 8: EHK). Wie bereits unter 6.2.1.1/2 gezeigt, konnte in allen 4 Transfektanten eine Expression des Fusionskonstruktes nachgewiesen werden. Für eine bessere Abschätzung wurde mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR der jeweilige AdoR-subtypspezifische cDNS-Gehalt der jeweiligen Transfektante mit der Kontrollzelllinie (EGFP-HeLa (EHK)) verglichen (Tab. 8). Man konnte im Falle der A2b-/A2aAdoR-Subtypen kaum eine Erhöhung des jeweiligen cDNS-Gehalts erkennen. A2aAdoR-Transfektanten zeigten im allgemeinen nur eine geringe Expression des Konstruktes mit einer erhöhten Lethalität der Zellpopulation. Im Falle der A1-/A3AdoR-Transfektanten konnte man ebenfalls keinen größeren Anstieg im AdoR-subtypspezifischen cDNS-Gehalt feststellen, was eventuell auf transkriptionelle Regulationsmechanismen in den entsprechenden Klonen hindeutet.

	A1HK	A2aHK	A2bHK	A3HK	EHK
A1AdoR	0.36±0.04	0.26±0.06	0.34±0.03	0.58±0.1	0.38±0.1
A2aAdoR	0.09±0.06	0.2±0.1	0.16±0.04	0.31±0.3	0.18±0.12
A2bAdoR	0.77±0.12	0.59±0.33	0.6±0.3	0.52±0.1	0.5±0.21
A3AdoR	0.05±0.04	0.02±0.01	0.06±0.04	0.03±0.01	0.03±0.01

Tab. 8: Relative cDNS-Gehalte der jeweiligen AdoR-Subtypen in den verschiedenen Transfektanten.

Vergleicht man die jeweiligen cDNS-Niveaus der einzelnen AdoR-Subtypen mit der Kontroll-Zelllinie, so lassen sich gewisse Tendenzen in den einzelnen Transfektanten erkennen.

cDNS-Niveaus des A1AdoR-Subtypes (Abb. 40) zeigen gegenüber der EGFP-HeLa-Kontrolle (EHK) eine Erhöhung in der unstimulierten A3-AdoR-Transfektante (A3HK), während keine nennenswerten Änderungen in den anderen 3 Transfektanten (A1HK bis A2bHK) zu beobachten war.

Diese Koamplifikation der inhibitorischen Subtypen könnte durchaus auf eine häufig beobachtete Interaktion dieser beiden Subtypen zurückzuführen sein.

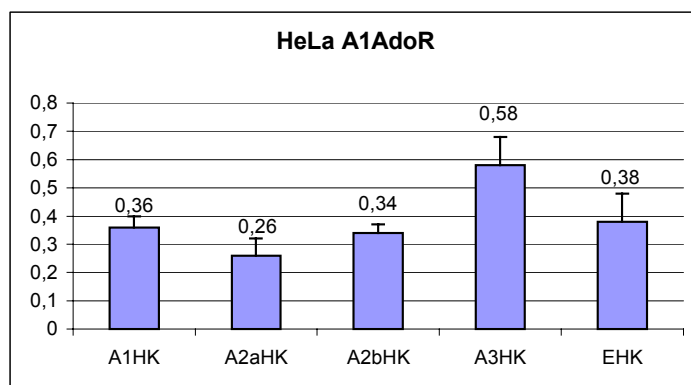


Abb. 40: Relative cDNS-Niveaus des A1AdoR-Subtypes in den 4 unstimulierten HeLa-Transfektanten (A1HK bis A3HK). Als Kontrolle diente die EGFP-HeLa-Linie (EHK).

Auch bei der Betrachtung der A2aAdoR-cDNS-Niveaus (Abb. 41) fiel ein leichter Anstieg des cDNS-Gehaltes in der A3AdoR-Transfektante (A3HK) auf, sowie eine leichte Abnahme in der A1AdoR-Transfektante (A1HK). Auch hier könnte man aufgrund verschiedener bekannter, zum Teil antagonistischer Interaktionen dieser Rezeptorsubtypen eine kooperierende Regulation der mRNS-Niveaus erwarten.

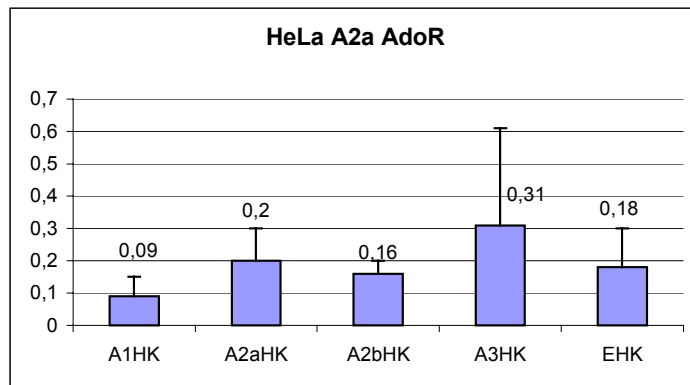


Abb. 41: Relative cDNS-Niveaus des A2aAdoR-Subtypes in den 4 unstimulierten HeLa-Transfektanten (A1HK bis A3HK). Als Kontrolle diente die EGFP-HeLa-Linie (EHK).

Im Falle des A2bAdoR-Subtypes fand man, schon in Hinblick auf die ohnehin schon große basale mRNS-Expression in der HeLa-Zelllinie, kaum einen Unterschied in den 4 verschiedenen Transfektanten. Am ehesten könnte man noch einen Effekt in der A1AdoR-Transfektante erkennen (Abb. 42: A1HK).

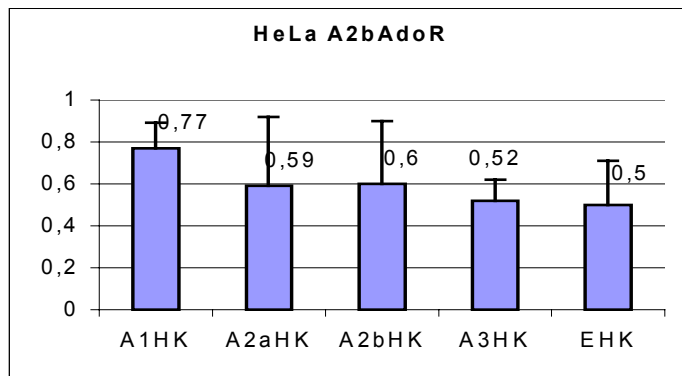


Abb. 42: Relative cDNS-Niveaus des A2bAdoR-Subtypes in den 4 unstimulierten HeLa-Transfektanten (A1HK bis A3HK). Als Kontrolle diente die EGFP-HeLa-Linie (EHK).

Eine doch deutliche Amplifikation des A3AdoR-Subtyps fand man in Transfektanten des A1AdoR- und des A2bAdoR-Konstruktes (Abb. 43: A1HK; A2bHK). Letzteres untermauert den, wie schon bei der A3-Transfektante am A1AdoR-Subtyp beobachtbaren, vermuteten gemeinsamen Regulationsmechanismus der inhibitorischen AdoR-Subtypen.

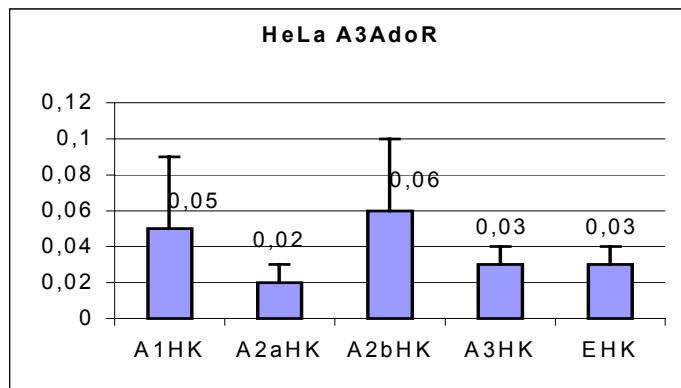


Abb. 43: Relative cDNA-Niveaus des A3AdoR-Subtypes in den 4 unstimulierten HeLa-Transfektanten (A1HK bis A3HK). Als Kontrolle diente die EGFP-HeLa-Linie (EHK).

6.4.2 Induktionsexperimente in den HeLa-Transfektanten

An den oben genannten Zelllinien wurde auf etwaige transkriptionelle bzw. posttranskriptionelle Regulationsmechanismen des AdoR-mRNA-Gehaltes untersucht. Hierfür wurde mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR der jeweilige cDNA-Gehalt der einzelnen AdoR-Subtypen in allen 4 Transfektanten nach Stimulation mit den jeweiligen Agonisten (NECA für die A2a-/A2bAdoR-Transfektanten bzw. R-PIA für die A1-/A3AdoR-Transfektanten) bestimmt und mit den entsprechenden Ergebnissen der Kontrollzelllinie (EGFP-HeLa) verglichen. Im Falle der NECA-Stimulation (N) wurde auch die Auswirkung eines längerfristig erhöhten cAMP-Niveaus auf den cDNA-Gehalt untersucht, indem die Phosphodiesterase mittels Ro 20-1724 inhibiert (RoN) wurde und somit ein konstant hohes cAMP-Niveau während der Stimulation aufrecht erhalten werden konnte. Da der Inhibitor Ro 20-1724 jedoch nur in alkoholischer Lösung zugegeben werden konnte, wurde, um etwaige Effekte des zugegebenen Alkohols abschätzen zu können, eine Kontrolle (EtOH) mit der entsprechenden Menge Alkohol inkubiert.

6.4.2.1. Excitatorische AdoR-HeLa-Transfektanten

Generell konnte man bei den Transfektanten der excitatorischen AdoR-Subtypen (A2aAdoR/A2bAdoR) einen Tag nach Stimulierung eine Erhöhung des jeweiligen AdoR-cDNA-Gehaltes bei allen 4 Subtypen erkennen (Tab. 9a-c; Abb. 44 a-c), der im Falle der A2aAdoR-Transfektante (Tab. 9a) im wesentlichen nicht nur auf einen etwaigen Alkohol-Effekt (Vergleich RoN- und EtOH-Ansätze) zurückzuführen war. Die A2bAdoR-Transfektante (Tab. 9b) zeigte allgemein geringere Änderungen der Niveaus nach Stimulierung. Im Falle der EtOH-Kontrollen fand man in allen Zelllinien eine erhöhte Mortalität, die besonders bei den A2b-/A3AdoR-Transfektanten auffiel. Jedoch zeigten die entsprechenden Zelllinien stimuliert mit NECA und Ro 20-1724 bzw. R-PIA kaum eine Abnahme der Vitalität. Deutlich war auch im Falle der A2a-/A2bAdoR-Transfektanten zu erkennen, daß ein konstant hohes cAMP-Niveau (mittels Ro 20-1724-Zugabe) einen deutlich höheren Effekt auf den cDNA-Gehalt hatte (Vergleich RoN- und N-Ansätze; Tab. 9a/b).

A2aHeLa

	RoN	N	K	EtOH
A1AdoR	1.58±0.22	0.37±0.13	0.47±0.03	0.46±0.08
A2aAdoR	1.96±0.74	0.64±0.65	0.65±0.38	0.61±0.44
A2bAdoR	0.9±0.06	0.56±0.08	0.5±0.09	0.42±0.02
A3AdoR	0.28±0.01	0.08±0.01	0.05±0.01	0.13±0.01

a

A2bHeLa

	RoN	N	K	EtOH
A1AdoR	1.1±0.22	0.38±0.08	0.63±0.12	0.63±0.12
A2aAdoR	0.77±0.25	0.53±0.19	0.46±0.2	0.81±0.05
A2bAdoR	1.16±0.27	1.1±0.28	1.11±0.06	1.39±0.34
A3AdoR	0.23±0.07	0.15±0.05	0.12±0.04	0.2±0.07

b

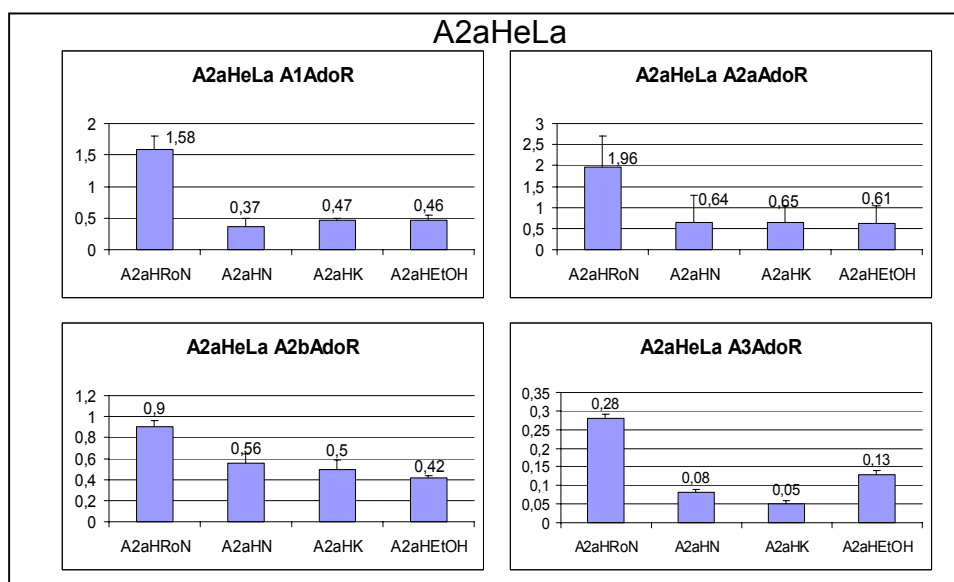
EGFPHeLa

	RoN	N	K
A1AdoR	0.24±0.18	0.02±0	0.38±0.01
A2aAdoR	0.32±0.39	0.03±0.02	0.18±0.12
A2bAdoR	0.32±0.38	0.07±0.01	0.5±0.21
A3AdoR	0.02±0	0.01±0.01	0.03±0

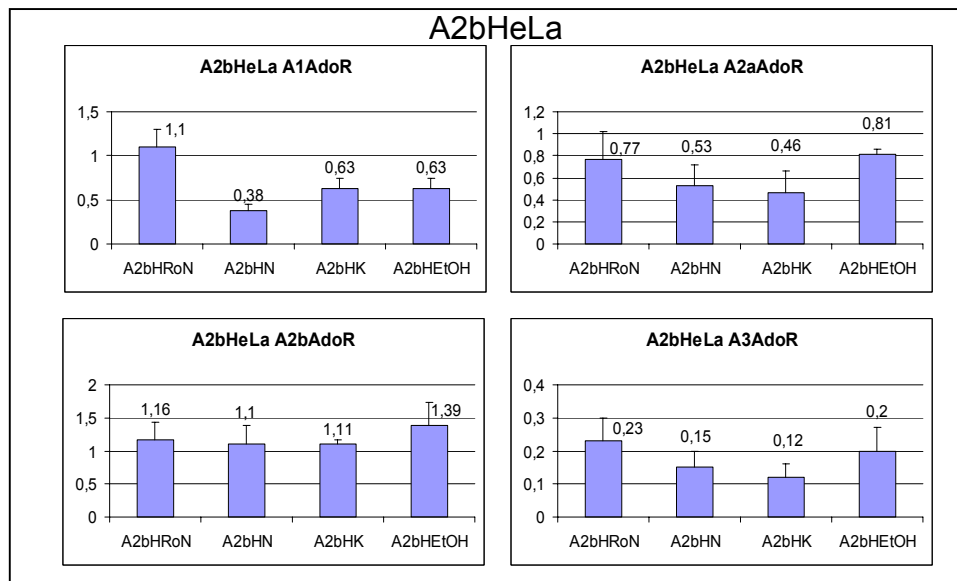
c

Tab. 9a-c: Induktionsexperimente mit den excitatorischen AdoR-Transfektanten.

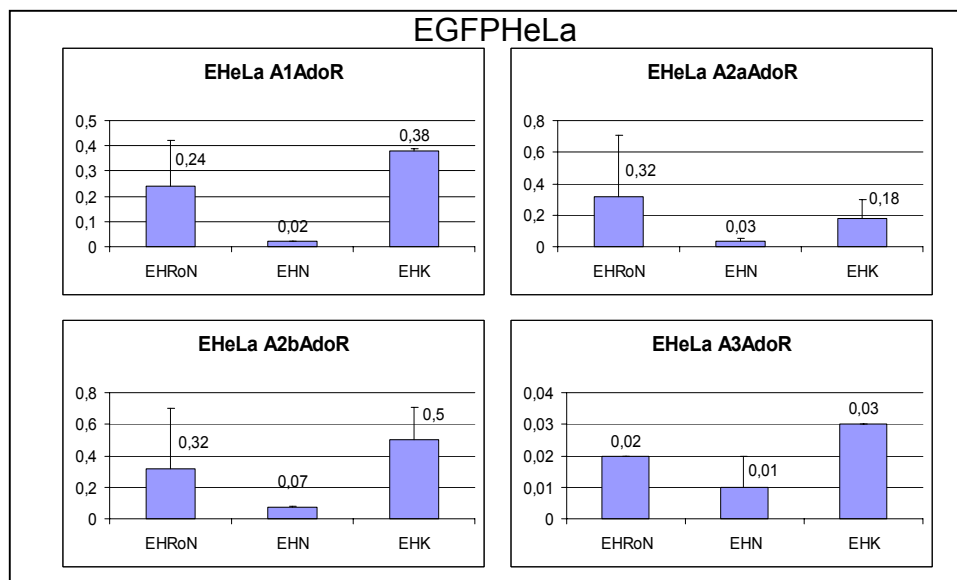
Dargestellt sind die relativen cDNS-Niveaus der jeweiligen Proben nach einem Tag (RoN: Induktion mit NECA und Phosphodiesterase-Inhibitor Ro 20-1724; N: NECA-Stimulation; K: Unstimulierte Kontrolle; EtOH: Kontrolle mit Zugabe von Alkohol).



a



b



c

Abb. 44a-c: Diagramme der Induktionsexperimente mit den excitatorischen AdoR-Transfektanten. Dargestellt sind die relativen cDNS-Niveaus der jeweiligen Proben nach einem Tag (RoN: Induktion mit NECA und Phosphodiesterase-Inhibitor Ro 20-1724; N: NECA-Stimulation; K: Unstimulierte Kontrolle; EtOH: Kontrolle mit Zugabe von Alkohol).

6.4.2.2. Inhibitorische AdoR-HeLa-Transfektanten

Die Transfektanten der inhibitorischen AdoR-Subtypen (A1AdoR/A3AdoR) zeigten nach Stimulierung mit R-PIA eher Tendenzen zu einer Verminderung des AdoR-cDNS-Gehaltes (Tab. 10a/b; Abb. 45a/b). Diese fiel bei Linien mit transfiziertem A1AdoR (A1HeLa; Tab. 10a) größer aus, als bei A3AdoR-Transfektanten (A3HeLa; Tab. 10b) und der Kontroll-Linie (EGFP-HeLa; Tab. 10c). Erwähnenswert ist auch, daß gerade in der A3AdoR-Transfektante nach Zugabe von Alkohol (EtOH) eine extreme Zunahme aller AdoR-Subtypen zu beobachten war (Tab. 10b; Abb. 45b). Ob das auf die starke Mortalität in den induzierten Proben zurückzuführen ist, kann nicht ausgeschlossen werden.

A1HeLa

	R-PIA	K	EtOH
A1AdoR	0.24±0.04	0.36±0.07	1.09±0.24
A2aAdoR	0.05±0.04	0.09±0.06	0.61±0.06
A2bAdoR	0.58±0.16	0.77±0.12	1.11±0.45
A3AdoR	0.05±0.05	0.05±0.04	0.18±0.07

a

A3HeLa

	R-PIA	K	EtOH
A1AdoR	0.59±0.14	0.58±0.12	3.41±0.6
A2aAdoR	0.26±0.08	0.31±0.3	1.42±0.38
A2bAdoR	0.72±0.17	0.52±0.1	1.03±0.13
A3AdoR	0.07±0.03	0.03±0.01	0.43±0.33

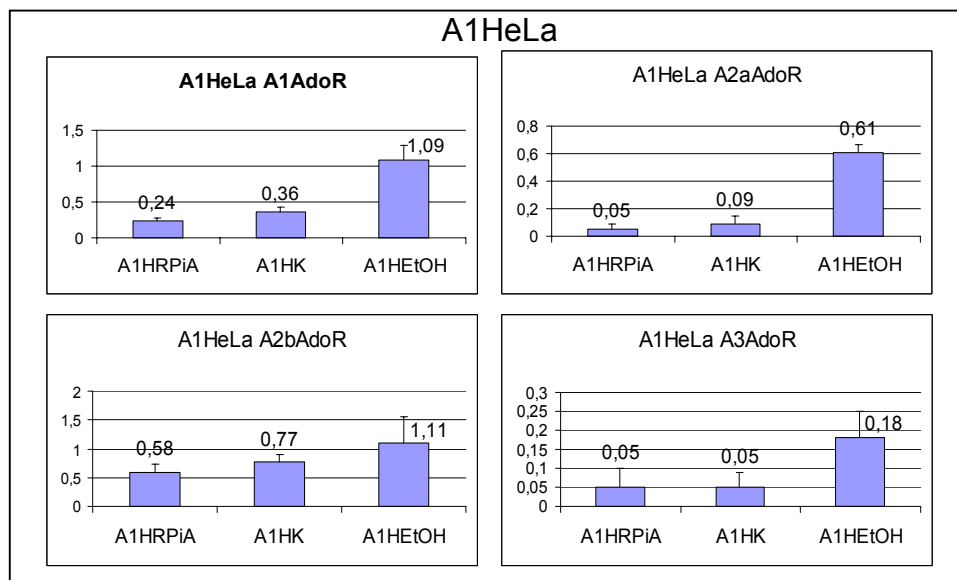
b

EGFPHeLa

	R-PIA	K	EtOH
A1AdoR	0.48±0.1	0.54±0.12	1.15±0.24
A2aAdoR	0.38±0.16	0.58±0.37	0.95±0.3
A2bAdoR	0.6±0.23	0.65±0.37	0.7±0.21
A3AdoR	0.07±0.02	0.09±0.02	0.19±0.02

c

Tab. 10a-c: Induktionsexperimente mit den inhibitorischen AdoR-Transfektanten (A1HeLa, A3HeLa). Dargestellt sind die relativen cDNS-Niveaus der jeweiligen Proben nach einem Tag (R-PIA: Induktion mit R-PIA; K: Unstimulierte Kontrolle; EtOH: Kontrolle mit Zugabe von Alkohol).



a

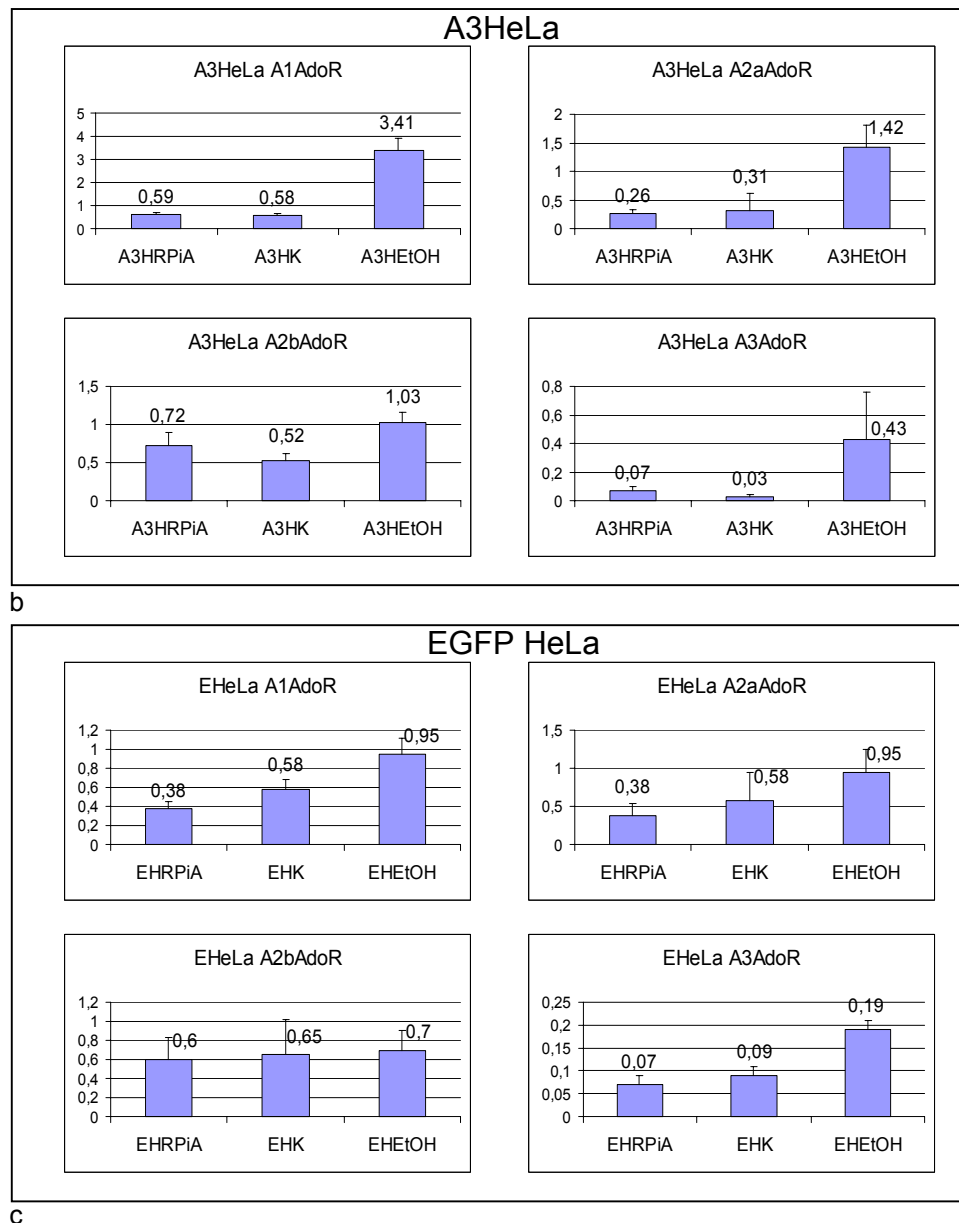


Abb. 45a-c: Diagramme der Induktionsexperimente mit den inhibitorischen AdoR-Transfektanten. Dargestellt sind die relativen cDNS-Niveaus der jeweiligen Proben nach einem Tag (R-PIA: Induktion mit R-PIA; K: Unstimulierte Kontrolle; EtOH: Kontrolle mit Zugabe von Alkohol).

6.5 Induktionsexperimente in der Raji-Zelllinie

Die Raji-Zelllinie stellt eine lymphoblastoide B-Tumorzelllinie dar, von der bekannt ist, daß sie überwiegend den A2aAdoR-Subtyp exprimiert. Dieser Subtyp ist maßgebend beteiligt bei der Regulation immunologischer Antworten, sowie bei der Differenzierung und dem Wachstum von Stammzelllinien des Immunsystems (siehe auch 2.2). Gerade in Hinblick auf die folgenden Untersuchungen der CLL-Blutproben wurde dieses System als Modellsystem für die wachstumsregulierenden Funktionen des A2aAdo-Rezeptors untersucht

Generell konnte man nach Stimulierung mit NECA nach einem Tag wiederum eine leichte Erhöhung des jeweiligen cDNS-Niveaus der AdoR-Subtypen erkennen (Tab. 11; Abb. 46), jedoch war dieser Effekt nur innerhalb des A2aAdoR-Subtyps deutlich ausgeprägt. Auch war dieser Effekt, wie bei den HeLa-Linien, in Anwesenheit des

Phosphodiesterase-Hemmers Ro 20-1724 am ausgeprägtesten. Zugabe von Alkohol zeigte in den meisten Fällen zwar einen leichten Anstieg der jeweiligen cDNS-Niveaus, die jedoch, mit Ausnahme des A2bAdoR-Subtypes, hinter dem stimulierenden Effekt des Agonisten (vergleiche RoN und EtOH) zurückblieb.

Raji

	RoN	N	K	EtOH
A1AdoR	0.67±0.31	0.16±0.05	0.18±0.06	0.33±0.07
A2aAdoR	2.7±0.59	0.63±0.08	0.59±0.28	1.01±0.11
A2bAdoR	0.74±0.12	0.35±0.11	0.44±0.3	0.99±0.04
A3AdoR	0.08±0.01	0.04±0.01	0.02±0.01	0.06±0.01

Tab. 11: Induktionsexperimente in der Raji-Zelllinie.

Dargestellt sind die relativen cDNS-Niveaus der jeweiligen Proben nach einem Tag (RoN: Induktion mit NECA und Phosphodiesterase-Inhibitor Ro 20-1724; N: NECA-Stimulation; K: Unstimulierte Kontrolle; EtOH: Kontrolle mit Zugabe von Alkohol).

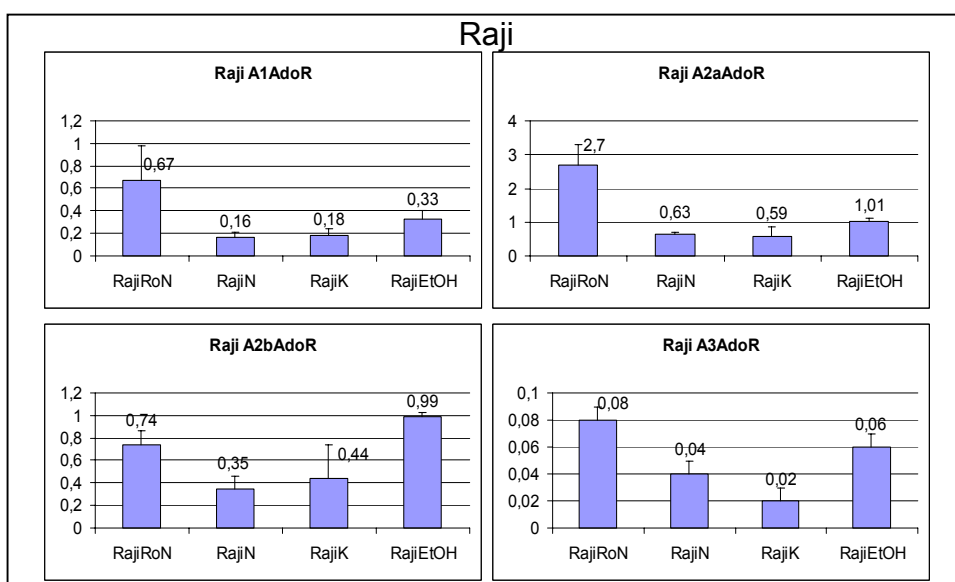


Abb. 46: Diagramme der Induktionsexperimente in der Raji-Zelllinie.

Dargestellt sind die relativen cDNS-Niveaus der jeweiligen Proben nach einem Tag (RoN: Induktion mit NECA und Phosphodiesterase-Inhibitor Ro 20-1724; N: NECA-Stimulation; K: Unstimulierte Kontrolle; EtOH: Kontrolle mit Zugabe von Alkohol).

6.6 Das Modellsystem der 493-6 Zelllinie

Diese etablierte B-lymphoblastoide Zelllinie ermöglichte die Untersuchung der AdoR-Response in Abhängigkeit zweier voneinander unabhängig regulierbarer mitogener Signale. Induktion eines vorgeschalteten Östrogen-Promotors ermöglichte die Transkription des EBNA-2-Proteins, welches ein virales Analog zu Bestandteilen der Notch-Signalkaskade darstellt und letztendlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B führt (Strobl *et al.* 1997).

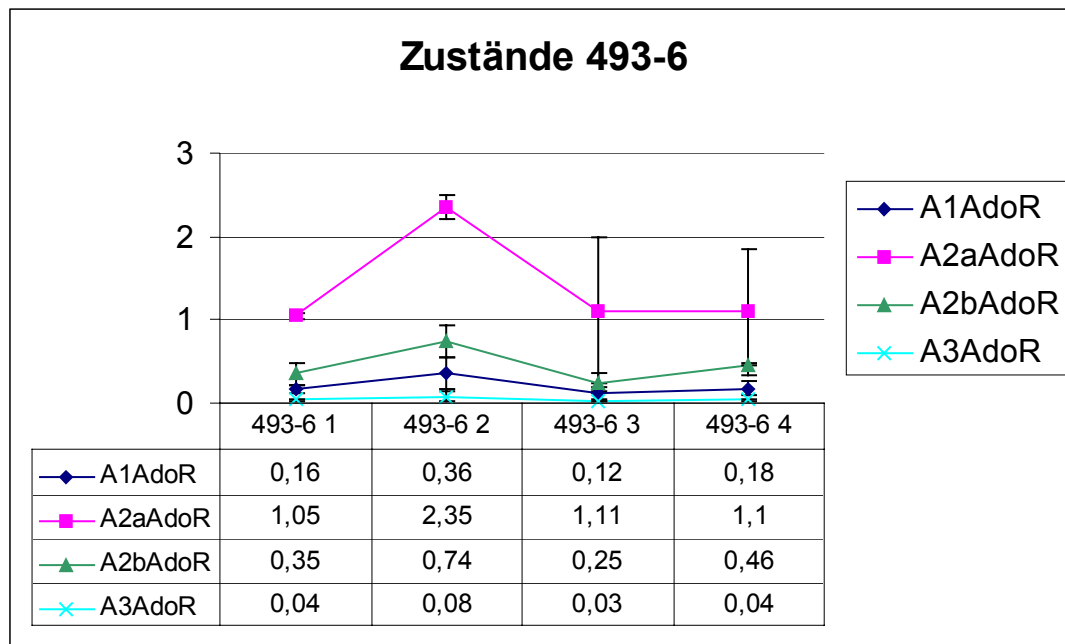
Die Transkriptionsaktivität eines c-myc-Expressionskonstruktes konnte mit Hilfe eines inhibitorischen „Tet-responsive Element“ reguliert werden. Das Proto-Onkogen c-myc, wie das virale EBNA-2 stellen starke mitogene Signale dar, deren Regulation in dieser Zelllinie zu unterschiedlich starkem Zellwachstums-Zuständen führten. Da oftmals verschiedene AdoR-Subtypen in verschiedenen Zelltypen an der Regulation des Zellwachstums bzw. -Differenzierung beteiligt sind, wurde dieses System auf Unterschiede in der Expression diverser Schlüsselenzyme des AdoR-Signaltransduktionsweges (ADA, CD73, AdoR) in den verschiedenen Induktionszuständen untersucht.

6.6.1 Vergleich der mRNS-Niveaus diverser Schlüsselkomponenten des AdoR-Signalweges in der 493-6 Zelllinie

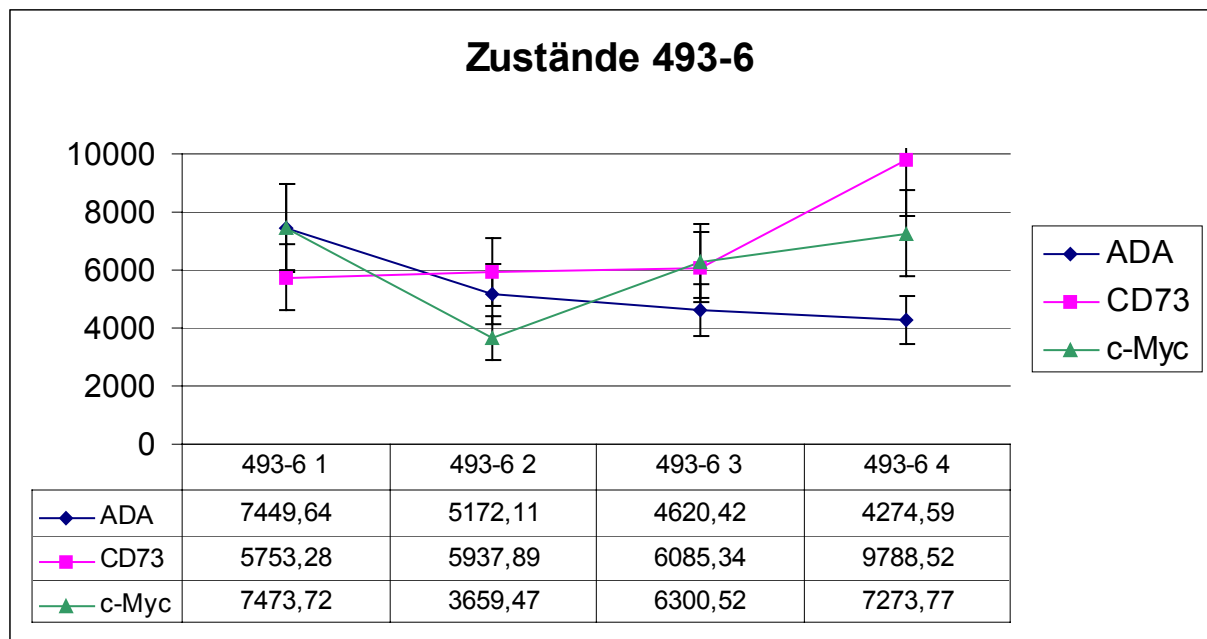
6.6.1.1 Semiquantitative RT-PCR

Mit Hilfe der beiden induzierbaren Expressionssysteme wurden zunächst die 4 unterschiedlichen Induktionszustände untersucht. Im Zustand 1 mit beiden transkriptionell aktiven Systemen (c-myc+/EBNA2+) ähnelte die Zelllinie einem Burkitt-Lymphom mit hoher Teilungsrate, gefolgt von den lymphoblastoid-artigen Zuständen 2 (c-myc-/EBNA2+) und 3 (c-myc+/EBNA2-) und dem Zustand 4 (c-myc-/EBNA2-), in dem die Zellen ihre Teilung einstellten.

Generell konnte man mit Abnahme der mitogenen Signale eine Zunahme des A2aAdoR-Niveaus, sowie einen parallel verlaufenden Anstieg des CD73-cDNS-Niveaus verzeichnen (Abb. 47a/b). Sowohl alle anderen AdoR-Subtypen, wie auch die ADA-Niveaus zeigten kaum Änderungen. Schon hier ließ sich in den meisten Experimenten ein Effekt des c-myc (Zustand 2 und 4 mit c-myc off) auf den cDNS-Gehalt der zuerst beschriebenen Proteine beobachten, der leider in dem hier dargestellten Experiment (Abb. 47a) gerade nicht so zu sehen war, in weiteren Experimenten jedoch immer wieder bestätigt werden konnte.



a



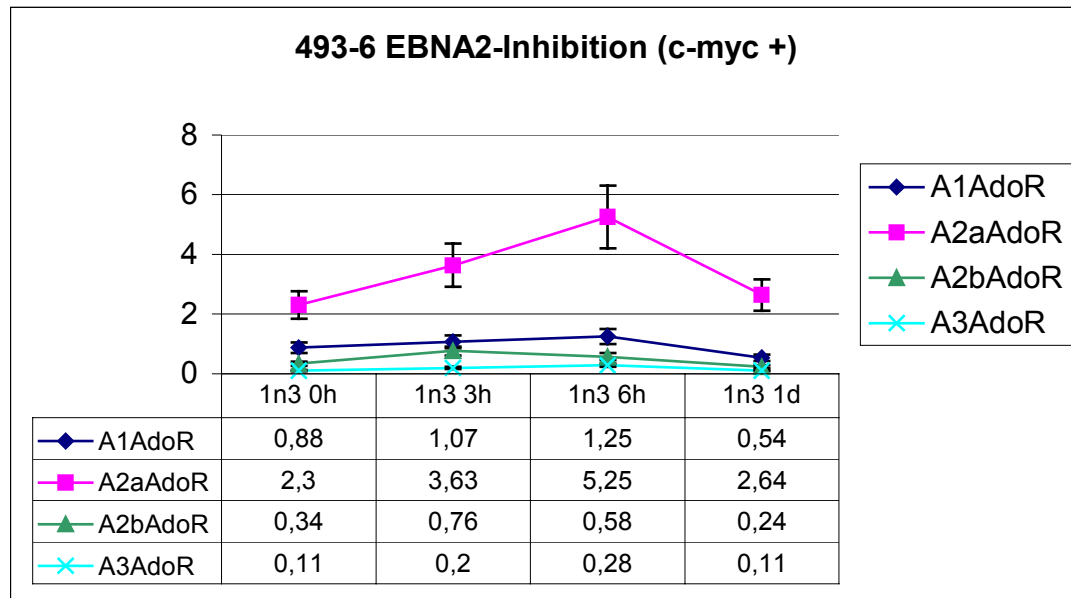
b

Abb. 47: a) Relative cDNS-Niveaus der AdoR-Subtypen in den 4 Induktionszuständen der 493-6-Zelllinie in abnehmender Mitogen-Signalstärke. Dargestellt wurde ein zusammenhängendes Experiment. b) Relative cDNS-Niveaus der ADA, CD73 und c-myc-Gene eines zusammenhängenden Experiments.

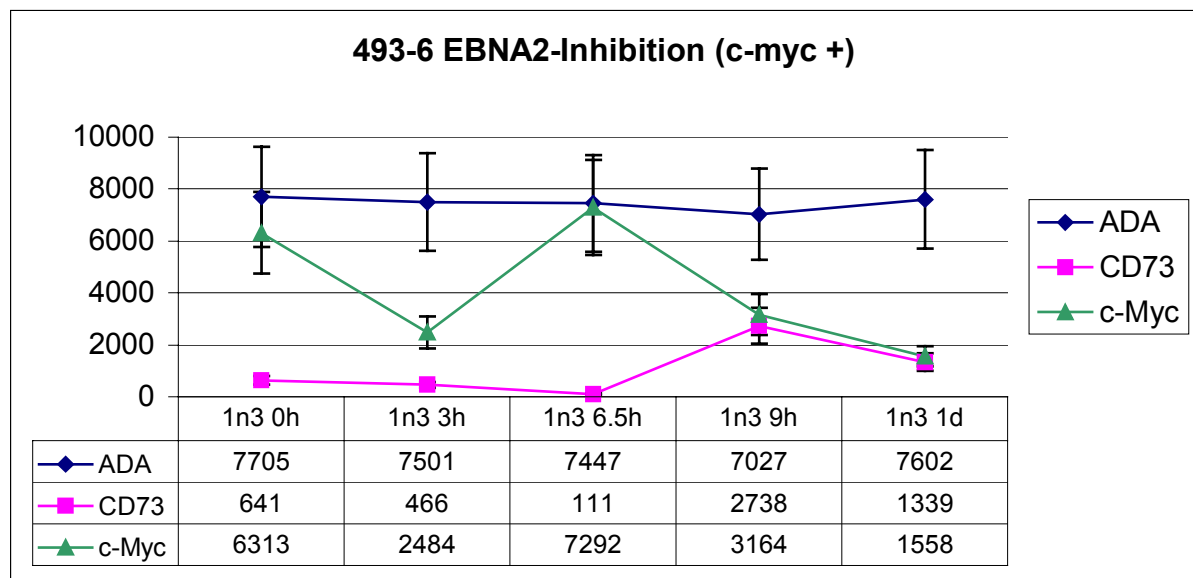
Um eventuelle Unterschiede der beiden Mitogene unterscheiden zu können, wurde der jeweilige zeitliche Verlauf der verschiedenen cDNS-Niveaus beim Abschalten des EBNA2-Mitogens in An- (1 nach 3) bzw. Abwesenheit (2 nach 4) einer c-myc-Transkription untersucht (Abb. 48 a und b).

Inhibition der EBNA2-Transkription in Anwesenheit von c-myc führte generell bereits nach 3 bis 6 Stunden zu einem deutlichen Anstieg des A2aAdoR-Niveaus (Abb. 48 a), gefolgt von einem leicht verzögertem Zuwachs der CD73-cDNS (zwischen 6 und 9 Stunden; Abb. 48b). Die in diesem Experiment beobachtete Abnahme des

A2aAdoR-Subtypes und der CD73-Aktivität von 9h bis nach einem Tag wurde in anderen Experimenten nicht beobachtet und stellt wohl ein Artefakt dar. Ebenso finden sich Irregularitäten in dem c-myc-Signal (Abb. 48b), die wohl auf unterschiedliche Kulturbedingungen der untersuchten Proben hindeuten.



a



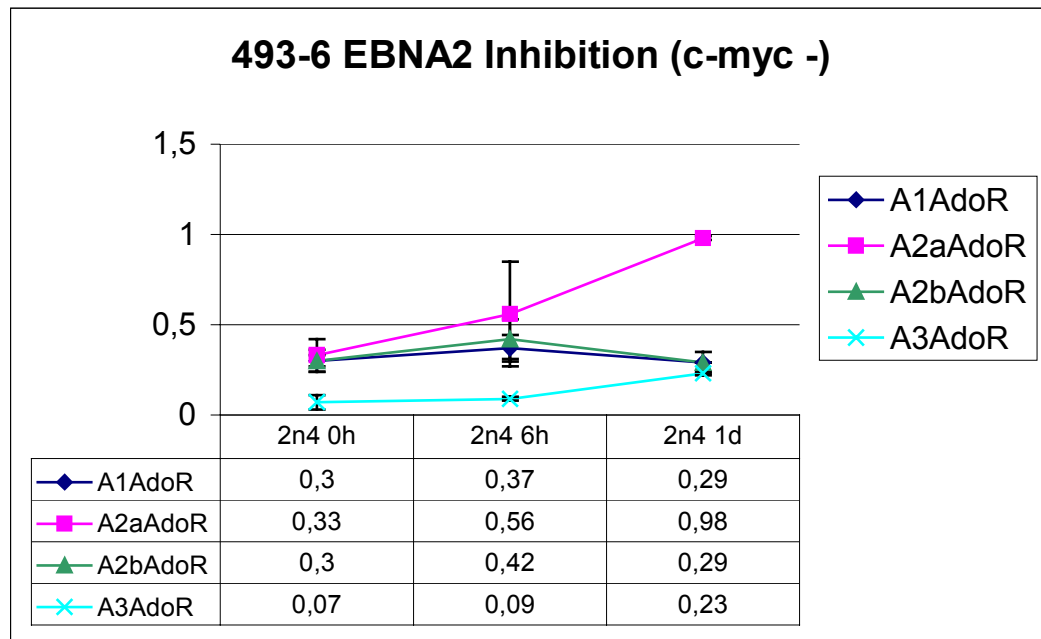
b

Abb. 48: a) Relative cDNS-Niveaus der AdoR-Subtypen im zeitlichen Verlauf nach der Abschaltung des EBNA2-Gens (c-myc jeweils +; Zustand 1 nach 3) Dargestellt wurde ein repräsentatives Experiment.

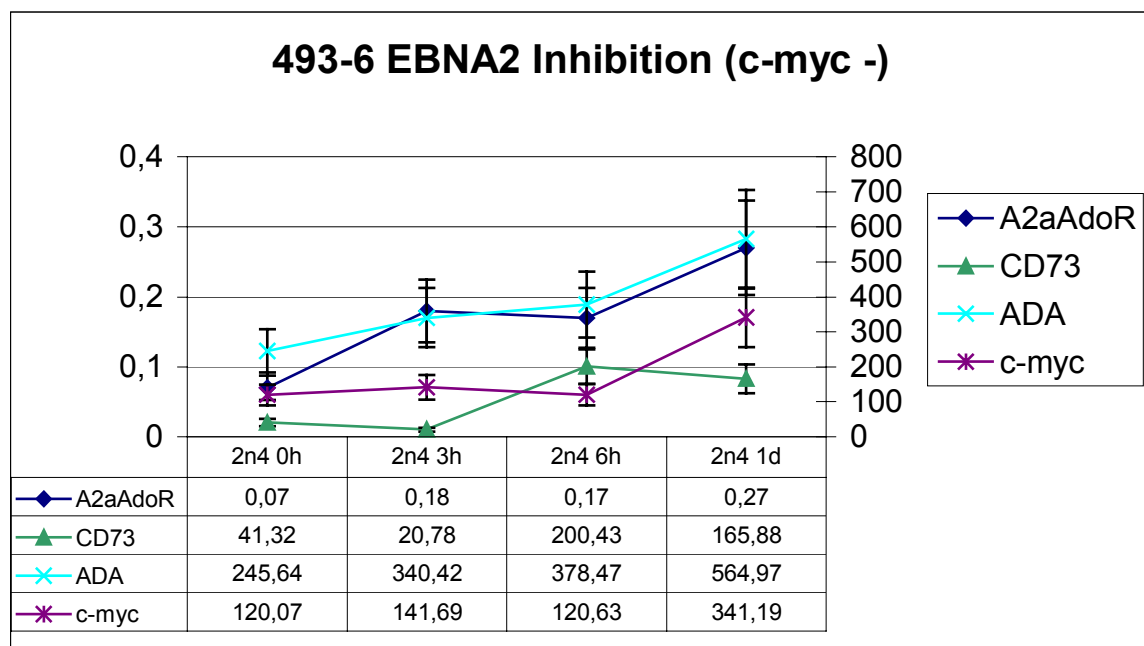
b) Relative cDNS-Niveaus der ADA, CD73 und c-myc-Gene im zeitlichen Verlauf nach der Abschaltung des EBNA2-Gens.

Auch im Falle der Abschaltung des EBNA2-Expressionssystems in Abwesenheit von c-myc fand man bereits nach 3 bis 6 Stunden einen deutlichen Anstieg des A2aAdoR-Niveaus (Abb. 49a) und wiederum einen leicht verzögerten Anwuchs des CD73-cDNS-Niveaus (Abb. 49b). Allgemein konnte man wiederum keine

signifikanten Änderungen in den cDNS-Niveaus der anderen untersuchten Gene feststellen.



a



b

Abb. 49: a) Relative cDNS-Niveaus der AdoR-Subtypen im zeitlichen Verlauf nach der Abschaltung des EBNA2-Gens (c-myc jeweils -; Zustand 2 nach 4) Dargestellt wurde ein repräsentatives Experiment.

b) Relative cDNS-Niveaus der A2aAdoR, ADA, CD73 und c-myc-Gene eines repräsentativen Experiments.

6.6.1.2 Northern Blot

Northern Blot-Analyse der 4 Induktionszustände erbrachte wiederum das bereits beschriebene Resultat. Es konnten eine Zunahme der A2aAdoR- und der CD73-mRNS mit sukzessiver Abschaltung der mitogenen Signale nachgewiesen werden

(Abb. 51). Zudem fiel ein jeweils etwas höheres A2aAdoR-mRNS-Niveau im Falle der Abschaltung des c-myc-Mitogens (Zustände 2 und 4) gegenüber den Zuständen mit exprimiertem c-myc (1 und 3) auf. Abschaltung der EBNA2-Transkription (2 und 4) zeigte ebenfalls einen Effekt, der jedoch geringer ausfiel. Die zuvor beobachtete Abnahme des ADA-Niveaus konnte in weiteren Experimenten nicht bestätigt werden.

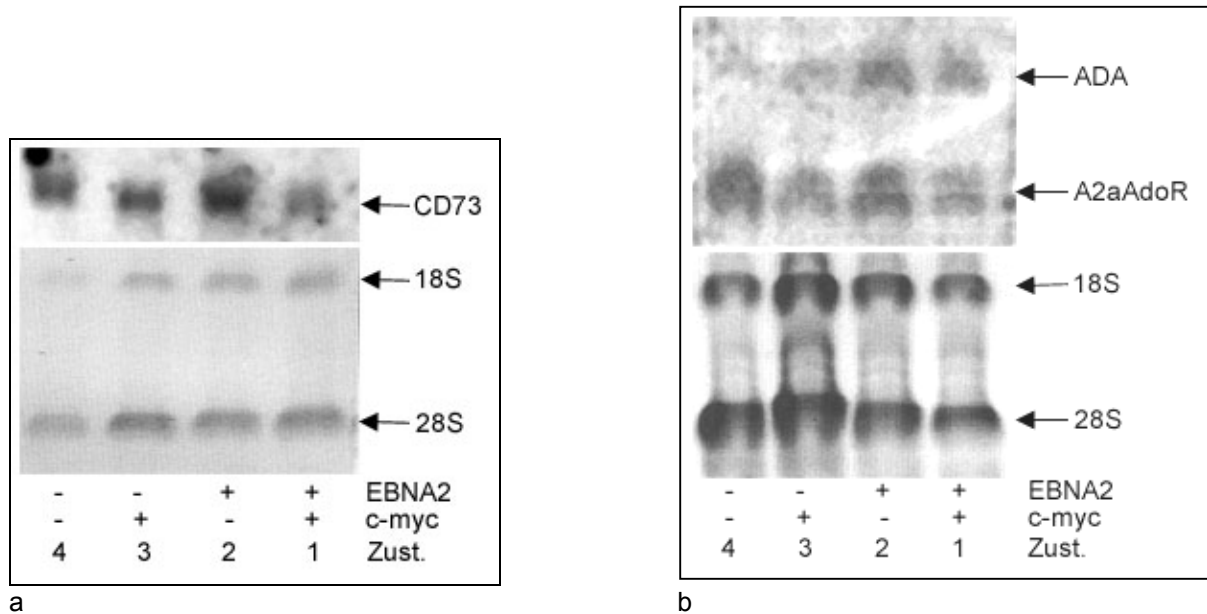


Abb. 50: Northern-Blot-Analyse der 4 Induktionszustände in der 493-6-Zelllinie.

a) Detektion des mRNS-Niveaus des CD73-Transkriptes. Als Mengenstandard wurde die Signalstärke der 18S- und 28S ribosomalen RNS-Bande verwendet. b) Detektion der mRNS-Niveaus der ADA- und A2aAdoR-Transkripte. Wiederum dienen die Signale der beiden ribosomalen RNS-Banden als Mengenstandard.

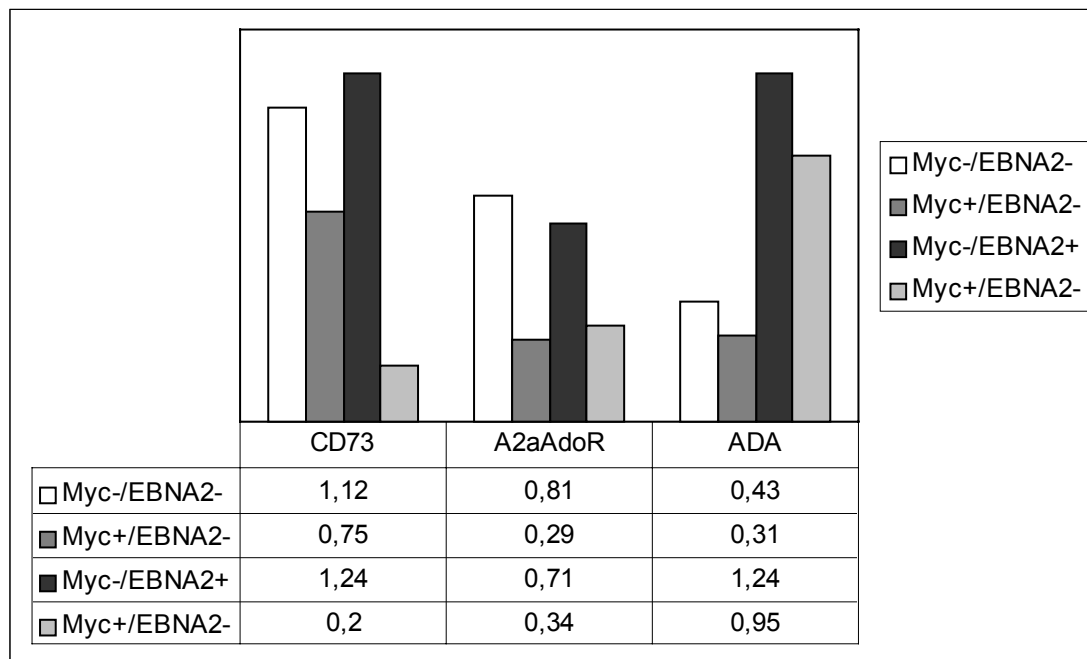


Abb. 51: Densitometrische Auswertung der Northern-Blot-Analyse. Alle Meßwerte wurden auf rRNS-Gehalt normalisiert. Zustände 1 bis 4 sind im Diagramm von rechts nach links dargestellt.

6.6.2 Untersuchung der cAMP-Signalstärke in stimulierten Proben der verschiedenen Induktionsniveaus

Da allem Anschein nach bei fehlenden mitogenen Signalen eine Hochregulation der A2aAdoR-mRNS-Niveaus und der ligandenliefernden Nukleotidase CD73 stattfindet, wurde innerhalb der 4 Induktionszustände der 493-6-Zelllinie die Menge des –von A2aAdoR induzierten- Messengers cyclo-AMP nach Stimulierung mit dem unselektiven AdoR-Agonisten NECA, oder mit dem A2aAdoR-selektiven Agonisten CGS21680 untersucht.

Es konnte gezeigt werden, daß mit abnehmenden mitogenen Signalen das Maximum des cAMP-Niveaus nach Stimulierung mit NECA und dem Phosphodiesterase-Hemmer Ro 20-1724 deutlich zunimmt (Abb. 52). Dieser Anstieg des cAMP-Niveaus konnte auch bei dem selektiven A2aAdoR-Agonisten CGS21680 beobachtet werden, was ein deutliches Indiz für eine Hochregulation der A2aAdoR-Präsenz darstellt. In anderen Experimenten zeigte sich auch schon im Zustand 2 (EBNA2+/c-myc-) eine Erhöhung des induzierbaren cAMP-Maximums, was auf ein Artefakt in dem hier gezeigtem Experiment hindeutet.

Ein ähnlicher Anstieg konnte auch bei Aktivitätsbestimmungen der CD73-Nukleotidase festgestellt werden (Gutensohn: unveröff. Ergebnisse)

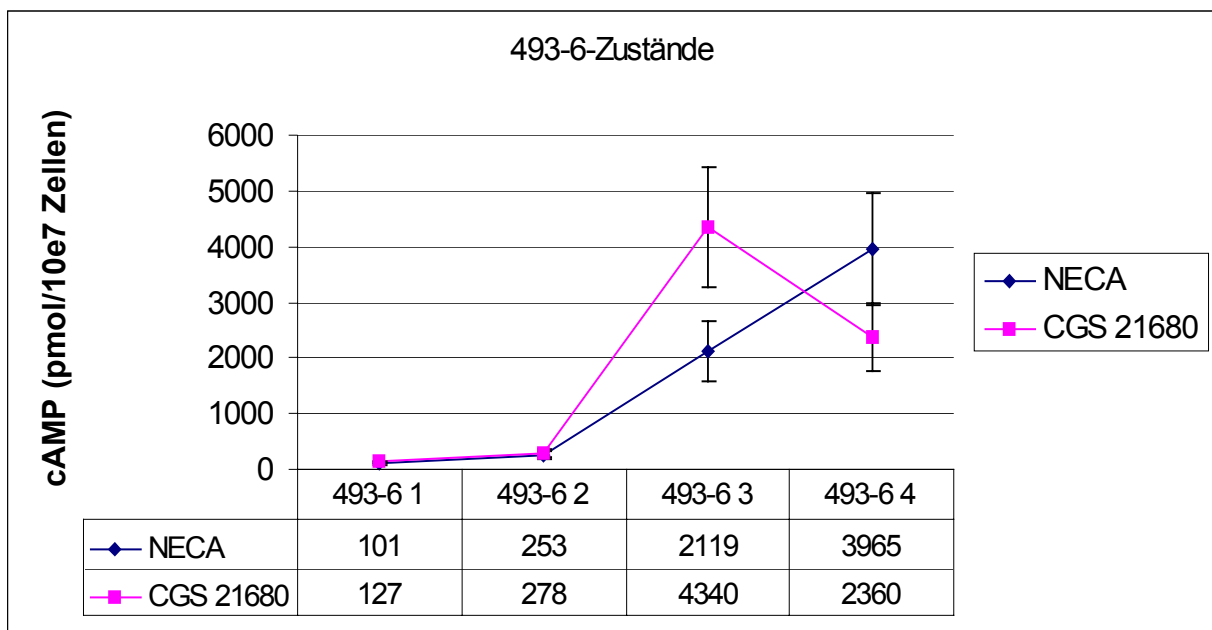


Abb. 52: cAMP-Niveaus (pmol pro 10^7 Zellen) der 4 Induktionszustände nach 5-minütiger Stimulierung mit NECA bzw. CGS21680 in Gegenwart von Ro 20-1724.

Verfolgte man das durch Stimulation maximal erreichbare cAMP-Niveau nach Inhibition der mitogenen Signale, so konnte ein Anstieg des Niveaus einen Tag nach Abschaltung der EBNA2- und c-myc-Transkription beobachtet werden (Abb. 53).

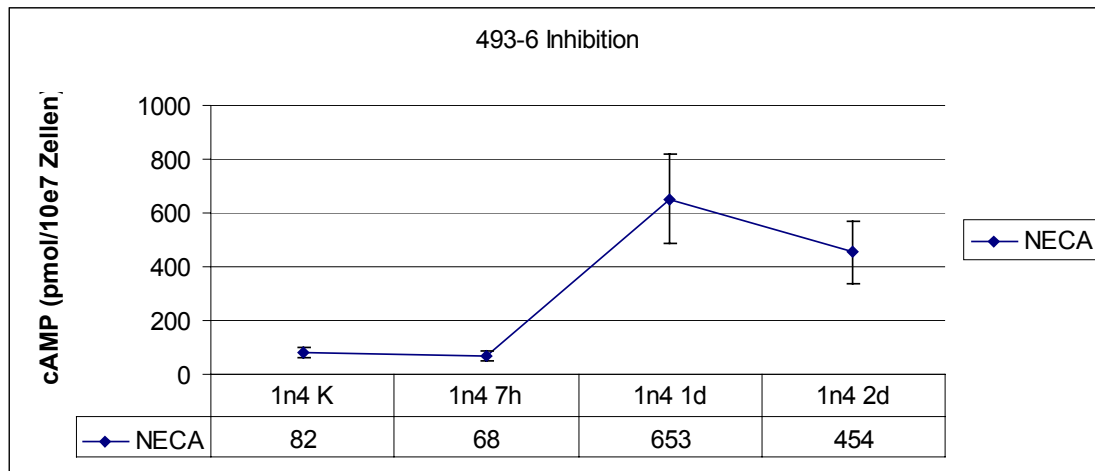


Abb. 53: Zeitlicher Verlauf der maximal mit NECA stimulierbaren cAMP-Niveaus nach Abschaltung der EBNA2- und c-myc-Transkription (Zustand 1 nach 4).

6.7 Studien zur CLL

Im Rahmen einer klinischen Studie zur CLL in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Emmerich (Klinikum Innenstadt/Hämato-Onkologie) wurden 48 Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie auf die Expression und Aktivität diverser Schlüssel-Komponenten des Ado-Signalweges hin untersucht. Für die jeweiligen cDNS-Niveaus der AdoR wurde hierfür die bereits etablierte semiquantitative RT-PCR verwendet. Eine – im Vergleich zur vorherig beschriebenen Meßmethode - nicht so genaue Abschätzung der cDNS von c-myc und ADA wurde über einfache densitometrische Auswertung der Gelbilder erhalten.

Für eine Aussage über die CD73-Aktivität werden im folgenden Meßdaten aus der Arbeitsgruppe Gutensohn verwendet. Es handelt sich dabei um eine enzymatische Meßmethode, bei der ^{14}C -markiertes 5'-AMP als Substrat zum Einsatz kam. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS

6.7.1 Daten zu Patienten und Kontrollen

Insgesamt wurden 48 Patienten im Alter zwischen 41 und 89 Jahren auf oben genannte Schlüsselenzyme bzw. cDNS untersucht und die Meßwerte mit Faktoren, wie Alter, Leukozyten-Anzahl und Binet-Stadium verglichen. Für eine komplette Übersicht über alle Daten siehe 9.3.

Deskriptive Statistik Patientengruppe					
	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Leuk x10e3	46	3,6	199,3	53,9	48,35
CD73	44	0,04	15,34	2,12	3,38
A1ADOR	48	0,46	3,97	1,58	0,7
A2aADOR	48	0,63	6,08	2,31	0,92
A2bADOR	48	0,13	1,39	0,52	0,28
A3ADOR	48	0,13	1,73	0,65	0,34
Alter	46	41	89	64,39	11,9
ADA	48	1343,14	10273,29	3954,31	1702,23
c-myc	48	464,59	3964,1	1790,85	810,79

Tab. 12: Deskriptive Statistik der Patientengruppe.

Als Kontrolle dienten je 5 männliche wie weibliche Kontrollpersonen im Alter zwischen 25 und 62 Jahren. Es wurden leider keine Leukozytenzahlen bestimmt und keine enzymatischen Messungen der CD73-Aktivität gemacht, jedoch ist ein Literaturwert von $5.4 \pm 3.2 \text{ nmol/h} \times 10^6 \text{ Zellen}$ und von etwa 6000 Leukozyten/ mm^3 als gegeben anzusehen.

Deskriptive Statistik Kontrollgruppe					
	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
A1ADOR	10	0,66	1,96	1,08	0,39
A2aADOR	10	0,81	3,12	1,74	0,68
A2bADOR	10	0,2	0,45	0,37	7,608E-02
A3ADOR	10	0,42	0,72	0,61	8,548E-02
Alter	10	25	62	34,6	12,24
ADA	9	1458,53	5569,54	3039,83	1245,36
c-myc	9	797,67	2062,01	1518,97	410,56

Tab. 13: Deskriptive Statistik der Kontrollgruppe

6.7.2 Abweichungen der Expressionsniveaus der Ado-Signalkomponenten in der CLL

Wirft man einen ersten Blick auf diese beiden Populationen, so erkennt man bereits anhand der Extremwerte und des Mittelwerts einen Unterschied der Expressionsmuster zwischen den CLL-Patienten (Tab. 12) und der Kontrollgruppe (Tab. 13), wobei man aber aufgrund der geringen Individuenanzahl der Kontrollgruppe noch keine großen Schlüsse ziehen kann. Erschwerend könnte noch hinzu kommen, daß die Kontrollgruppe deutlich jüngeren Alters ist.

Betrachtet man dennoch den Mittelwert der Kontrollgruppe der jeweiligen untersuchten Schlüsselgene/-Enzyme und berechnet man deren Standardabweichung σ , so finden sich in der Patientengruppe eine deutliche Anzahl an Expressionsabweichungen jenseits der 2σ -Grenze (Tab. 14).

	A1AdoR	A2aAdoR	A2bAdoR	A3AdoR	ADA	c-myc
MW	1,08	1,74	0,37	0,61	3039,83	1518,97
C01		2,48	0,25	0,67	1695,69	464,59
C02		3,48	0,7			
C03						
C04				0,31		
C05			0,54	0,88		
C06			0,55	0,33		598,89
C07			0,59			
C08	2,11	3,5	1,39	0,95		
C09			0,88			2383,7
C10			0,91	0,26		
C11						
C12			0,71		5576,34	
C13	2,21		0,75			2939
C14						
C15	2,44		0,87			
C16			0,97	0,85		
C17	2,42		1,12	1,1		

	A1AdoR	A2aAdoR	A2bAdoR	A3AdoR	ADA	c-myc
MW	1,08	1,74	0,37	0,61	3039,83	1518,97
C18	2,26		0,8	1,22		2553,33
C19				1,02		
C20		3,12	0,73			
C21				0,32		
C22	2,22					
C23				0,17		509,06
C24	3,54		1,17	1,73	8880,47	2466,67
C25						
C26	1,94	3,65		0,42		
C27	2,47	6,08	0,87			
C28						
C29						3556,42
C30						
C31						2961,53
C32				1,05		
C33		3,36				2525,44
C34		3,28		0,96		
C35			0,18	0,4		
C36	3,97					
C37				0,17		
C38				1,66		
C39				0,13		
C40						
C41	2,89					2934,72
C42			0,13	0,33		
C43			0,16	0,37		
C44				0,42	5615,34	2411,27
C45				1,05	6730,59	
C46			0,19	0,97	6278,77	2443,79
C47				0,97		3212,06
C48		3,4			10273,29	3964,1

Tab. 14: Übersicht über die gefundenen Abweichungen der Expression der AdoR, sowie c-myc und ADA der CLL-Patienten (C01-C48) jenseits der 2 σ -Grenze der berechneten Kontrollgruppen-Mittelwerte (MW). Die Werte der ADA und c-myc-Abweichungen sind gesondert zu betrachten. Hochregulationen wurden Rot, „Downregulationen“ blau unterlegt.

Häufig fand man eine Hochregulation diverser Rezeptorsubtypen, die jedoch keinem eindeutigen Schema zu folgen schien. Meistens findet man aber die Modifikation mehrere Schlüsselgene in einem Patienten, was auf einen umfassenden Selektionsmechanismus in der CLL hindeuten könnte.

6.7.3 Korrelationen innerhalb der untersuchten Gene/Enzyme

Um Abweichungen in der Expression der untersuchten Gene/Enzyme mit einem etwaigen prognostischen Wert in der Vorhersagbarkeit des Krankheitsverlaufes zu eruieren, wurden alle untersuchten Eigenschaften und Meßwerte einer Korrelationsanalyse nach Pearson unterzogen, die man in den folgenden Tabellen zusammengefaßt sieht.

	Alter	Leuk x10e3	CD73	A1AdoR	A2a AdoR	A2b AdoR	A3 AdoR	ADA	c-myc
Alter	1	,324(*)	-0,169	-0,124	-0,124	-0,208	-,300(*)	-,425(**)	-0,269
Leuk x10e3	,324(*)	1	-0,211	-0,033	-,375(*)	-0,017	-0,194	-0,016	-0,138
CD73	-0,169	-0,211	1	-0,025	0,037	-0,007	-0,065	-0,026	-0,05
A1 AdoR	-0,124	-0,033	-0,025	1	,332(*)	,463(**)	,460(**)	,315(*)	,373(**)
A2a AdoR	-0,213	-,375(*)	0,037	,332(*)	1	0,275	0,076	0,122	0,183
A2b AdoR	-0,208	-0,017	-0,007	,463(**)	0,275	1	,314(*)	,326(*)	0,176
A3 AdoR	-,300(*)	-0,194	-0,065	,460(**)	0,076	,314(*)	1	,361(*)	,321(*)
ADA	-,425(**)	-0,016	-0,026	,315(*)	0,122	,326(*)	,361(*)	1	,593(**)
c-myc	-0,269	-0,138	-0,05	,373(**)	0,183	0,176	,321(*)	,593(**)	1

Tab. 15: Korrelation der Patientendaten nach Pearson. 2-seitig signifikante Werte auf dem Niveau 0.05 bzw. 0.01 wurden mit * bzw. ** gekennzeichnet. Die nur einfach quantifizierten RT-PCR-Daten für ADA und c-myc sind gesondert zu betrachten.

	Alter	A1 AdoR	A2a AdoR	A2b AdoR	A3 AdoR	ADA	c-myc
Alter	1	0,268	0,347	0,625	-0,239	0,484	0,241
A1 AdoR	0,268	1	,785(**)	0,428	0,172	,804(**)	0,55
A2a AdoR	0,347	,785(**)	1	0,252	-0,271	0,664	0,434
A2b AdoR	0,625	0,428	0,252	1	-0,229	0,431	0,404
A3 AdoR	-0,239	0,172	-0,271	-0,229	1	0,276	0,163
ADA	0,484	,804(**)	0,664	0,431	0,276	1	,791(*)
c-myc	0,241	0,55	0,434	0,404	0,163	,791(*)	1

Tab. 16: Korrelation der Kontrolldaten nach Pearson. 2-seitig signifikante Werte auf dem Niveau 0.05 bzw. 0.01 wurden mit * bzw. ** gekennzeichnet. Die nur einfach quantifizierten RT-PCR-Daten für ADA und c-myc sind gesondert zu betrachten.

Mit zunehmenden Alter fand man in den Patienten eine deutliche Tendenz der Zunahme der Leukozytenanzahl, deren Verdoppelungsrate einen wichtigen prognostischen Faktor der CLL darstellt, jedoch auch Tendenzen der Abnahme der A3AdoR- und evtl. der ADA-Expression.

Erhöhte Leukozytenmengen waren vor allem mit einer Abnahme der A2aAdoR-Transkription korreliert.

Das Expressionsniveau des A1AdoR schien hauptsächlich mit der Expression der A2aAdoR, A2bAdoR, A3AdoR, wie evtl. mit der c-myc und ADA verknüpft zu sein, zeigte jedoch kaum Korrelationen mit der Leukozytenanzahl oder CD73-Aktivität.

Das Niveau des A2aAdoR schien innerhalb der untersuchten Patientengruppe mit den Niveaus des A1- wie A3AdoR, sowie evtl. der ADA korreliert zu sein.

Transkription des A3AdoR korrelierte mit den Niveaus des A1AdoR, wie auch des A2bAdoR und schien mit der Expression von ADA und c-myc einher zu gehen.

ADA-Niveaus zeigten evtl. gemeinsame Regulationstendenzen mit dem A1AdoR, wie auch der c-myc. Die c-myc-Expression wiederum, schien gemeinsam mit der A1AdoR, wie A3AdoR-Expression reguliert zu werden.

Insgesamt zeigten also gerade die AdoR-Regulationen in den CLL-Patienten vielfache gemeinsame Tendenzen in der Transkriptionsregulation ihrer Gene. Auch schien die ADA- und c-myc-Regulation in diese Korrelationen miteinbezogen zu sein. Besonders zu erwähnen ist die relativ starke Korrelation des A2aAdoR mit der Leukozytenanzahl, von dem ja bekannt ist (Barbieri *et al.* 1998), daß er Apoptosis in B-Lymphozyten von CLL-Patienten induzieren kann.

Abschließend sollte noch erwähnt werden, daß im Rahmen der Aktivitätsbestimmung der CD73 in unserem Labor eine doch deutlichere negative Korrelation zwischen Leukozytenanzahl und der CD73-Aktivität zu beobachten war (Gutensohn unveröffentlichte Ergebnisse; Abb.54).

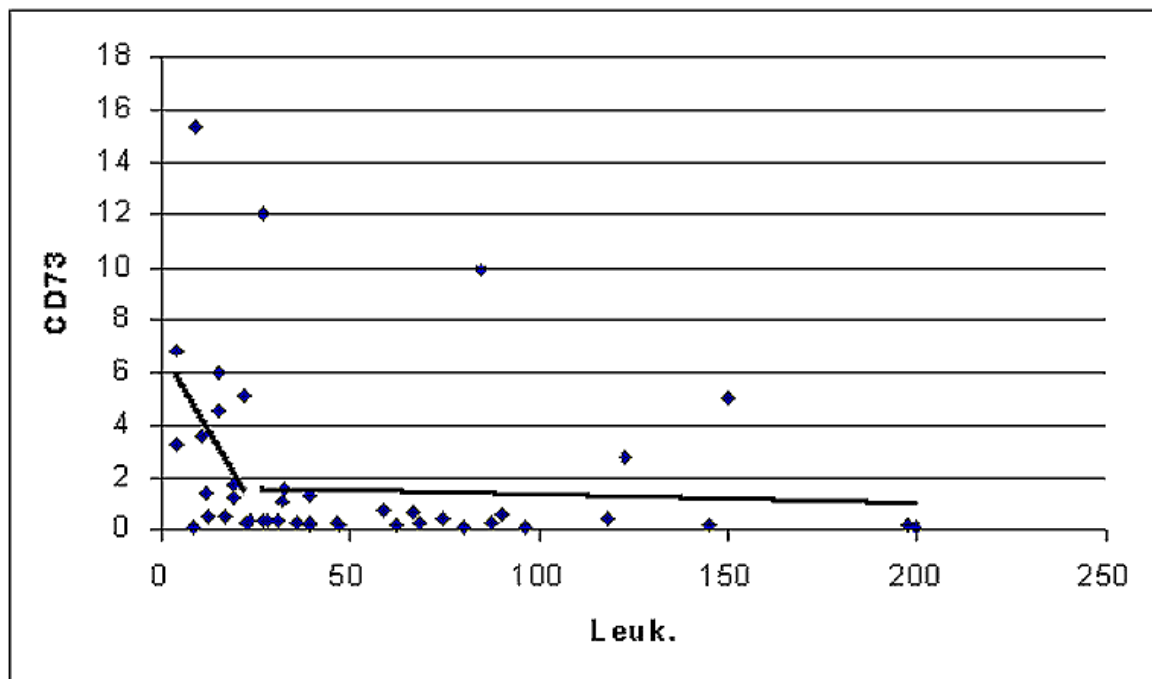


Abb. 54: Korrelationsdiagramm der CD73-Aktivität zur Leukozytenanzahl (Leuk.) in der Patientengruppe. Mit zunehmender Zellzahl findet man bis ca. 25×10^3 Zellen/ml eine starke Abnahme der CD73-Aktivität, der eine anschließende schwache Abnahme bei Leukozytenzahlen größer 25×10^3 Zellen folgt. Für eine Verdeutlichung der Tendenzen wurden die Regressionsgeraden der entsprechenden Abschnitte eingefügt

Betrachtet man Korrelationen in der Kontrollgruppe, so findet man gemeinsame Tendenzen mit der Regulation des A2aAdoR, wie evtl. der ADA-Niveaus mit dem A1AdoR. Ebenso zeigte sich eine, wie bei den Patienten beobachtete, leichte Korrelation zwischen ADA und c-myc. Jedoch waren keine Korrelationen des A3AdoR mit Lebensalter oder eine gemeinsame Tendenz in der A1AdoR und A3AdoR-Expression erkennbar.

Trotz der relativ geringen Anzahl der Personen in der Kontrollgruppe zeichnet sich eine doch modifizierte Regulation der AdoR in der CLL-Patientengruppe ab, sowie eine erkennbare Modulation der CD73, wie aber auch der c-myc und der ADA.

Im Folgendem wurden zur Veranschaulichung die einzelnen möglichen Interaktionen der untersuchten Gene/Enzyme graphisch gegeneinander aufgetragen.

6.7.3.1 Leukozytenanzahl

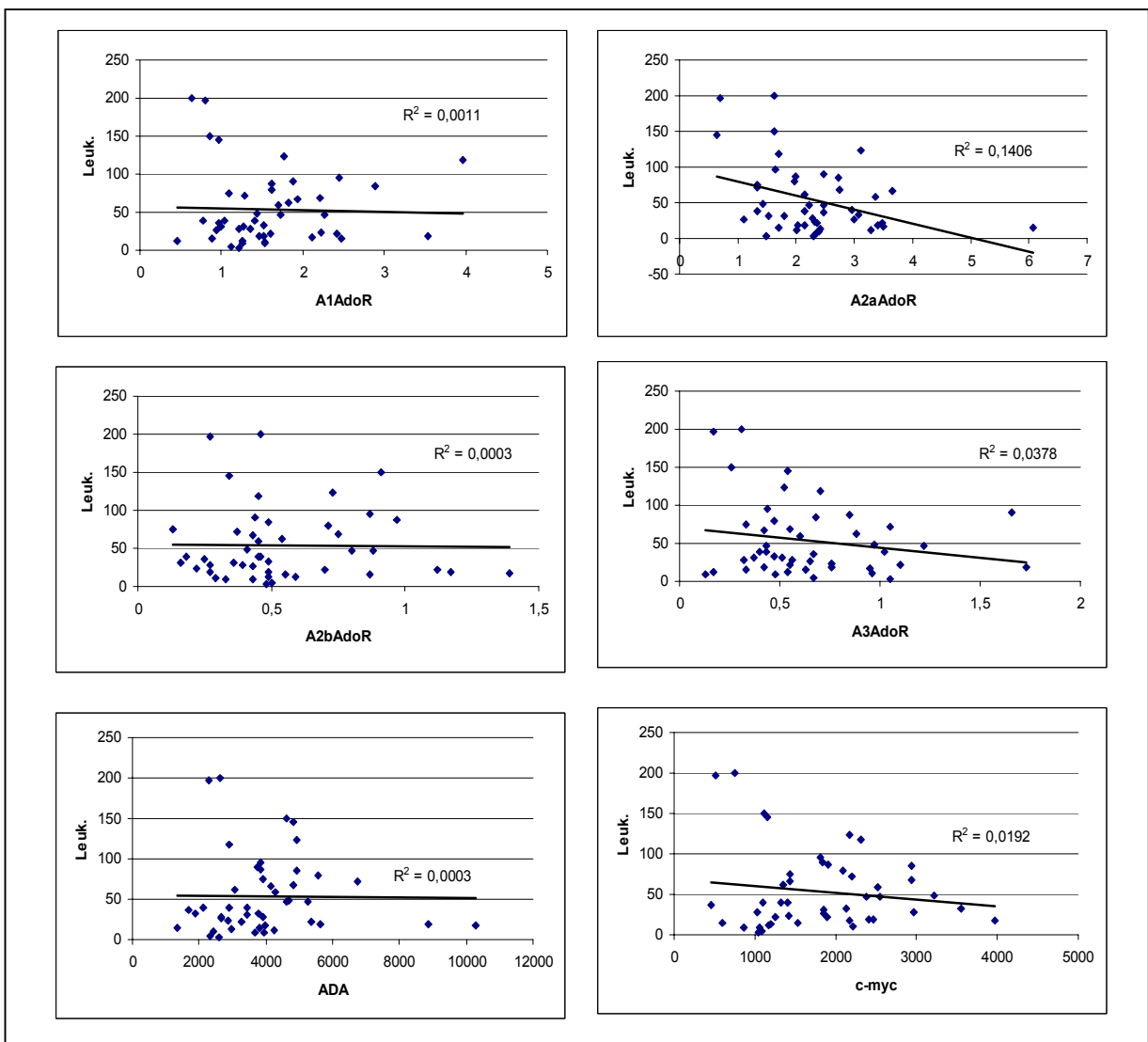


Abb. 55: Diagramm zur Korrelationsanalyse der Leukozytenanzahl (Leuk.) gegen die jeweiligen untersuchten Gene/Enzyme. ADA und c-myc sind aufgrund der Meßmethode gesondert zu betrachten. Ergebnisse der linearen Regression sind als Gerade dargestellt. Das Quadrat der Signifikanz dieser Regression (R^2) ist ebenfalls angegeben.

Trägt man die Leukozytenanzahl gegen die jeweiligen untersuchten Gene/Enzymaktivitäten auf (Abb. 55), so findet man tendenziell wiederum, wie bei der Korrelationsanalyse nach Pearson, eine gute negative Korrelation zur A2aAdoR-Transkription, sowie eine leichte negative zur A3AdoR und c-myc-Expression. Die Korrelation zwischen der CD73-Aktivität und der Leukozytenanzahl wurde bereits vorhergehend beschrieben (Abb. 54).

6.7.3.2 Binet-Stadien

Binet-Stadien ermöglichen eine weitere Klassifizierung des CLL-Phänotyps. Mit fortschreitendem Krankheitsverlauf werden 3 Klassen von A bis C definiert.

Anhand der bis dato gewonnenen Strichproben konnten keine eindeutigen Korrelationen zwischen den Binet-Stadien und der Expressionsverteilung der einzelnen untersuchten Gene/Enzyme gefunden werden (siehe Abb. 56).

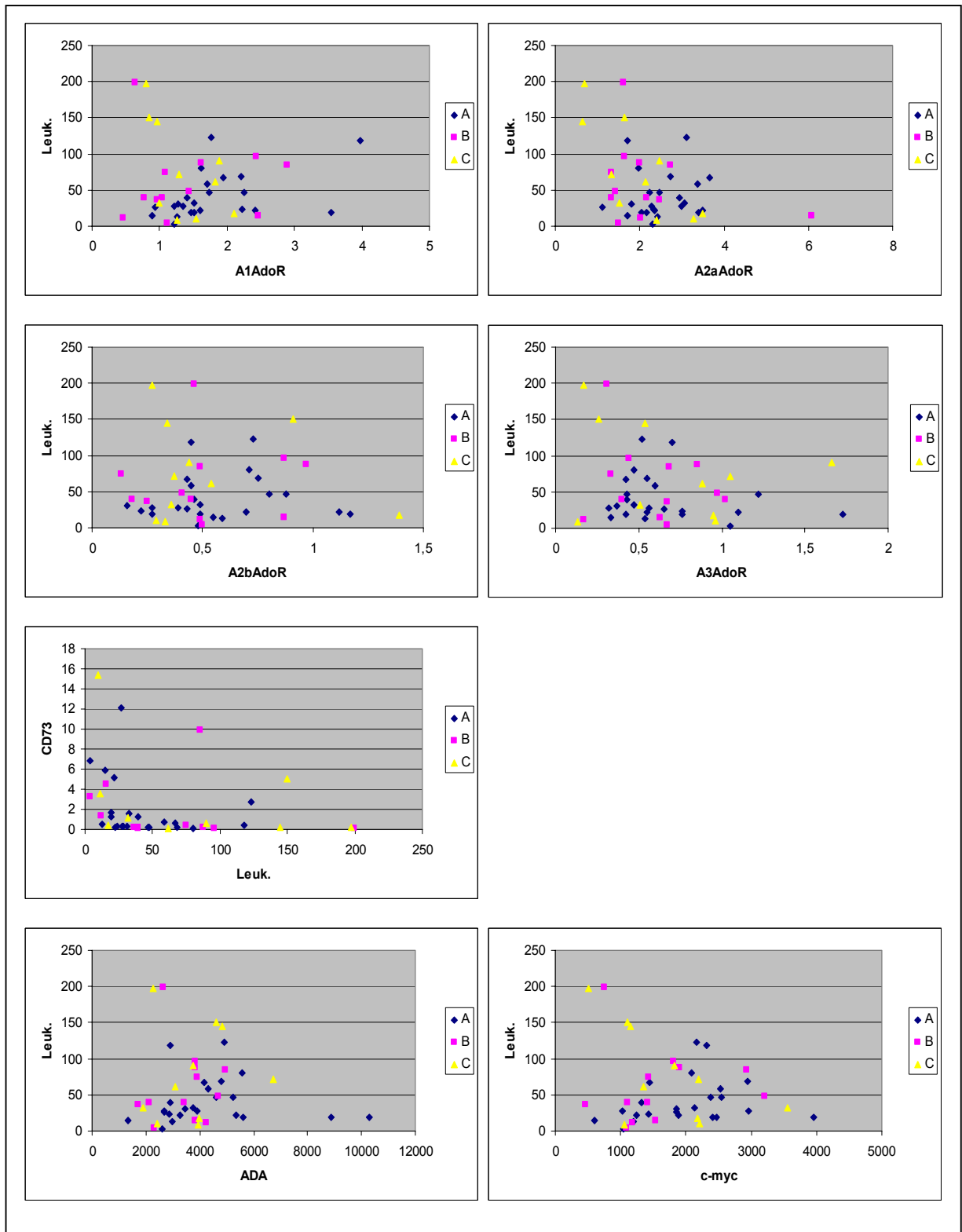


Abb. 56: Diagramm zur Korrelationsanalyse der Leukozytenanzahl (Leuk.) gegen die jeweiligen untersuchten Gene/Enzyme. Zusätzlich wurden die Meßpunkte anhand der 3 Binet-Stadien A, B und C eingeteilt. ADA und c-myc sind aufgrund der Meßmethode gesondert zu betrachten.

6.7.3.3 CD73-Aktivität

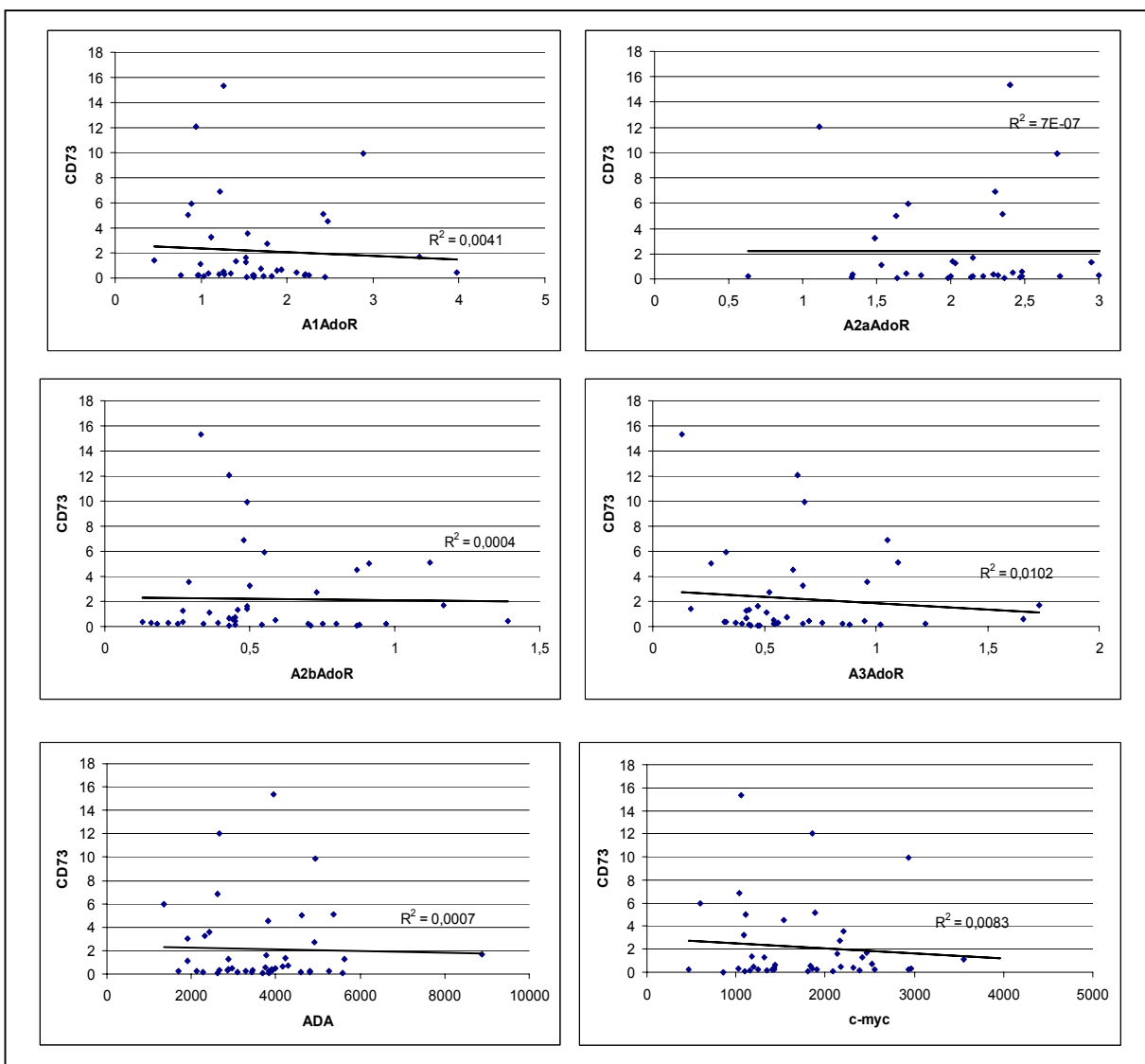


Abb. 57: Diagramm zur Korrelationsanalyse der CD73-Aktivität (CD73 in nmol/h $\times 10^6$ Zellen) gegen die jeweiligen untersuchten Gene/Enzyme. ADA und c-myc sind aufgrund der Meßmethode gesondert zu betrachten. Ergebnisse der linearen Regression sind als Gerade dargestellt. Das Quadrat der Signifikanz dieser Regression (R^2) ist ebenfalls angegeben.

Wie man bereits bei der vorhergehenden Korrelationsanalyse nach Pearson erkennen konnte, zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der CD73-Aktivität und den untersuchten Komponenten (Abb. 57). In den meisten Fällen fand man bei Patienten mit niedriger CD73-Aktivität ein breites Verteilungsspektrum der untersuchten cDNS-Niveaus, ebenso wie bei Patienten mit höherer CD73-Aktivität.

6.7.3.4 A1AdoR

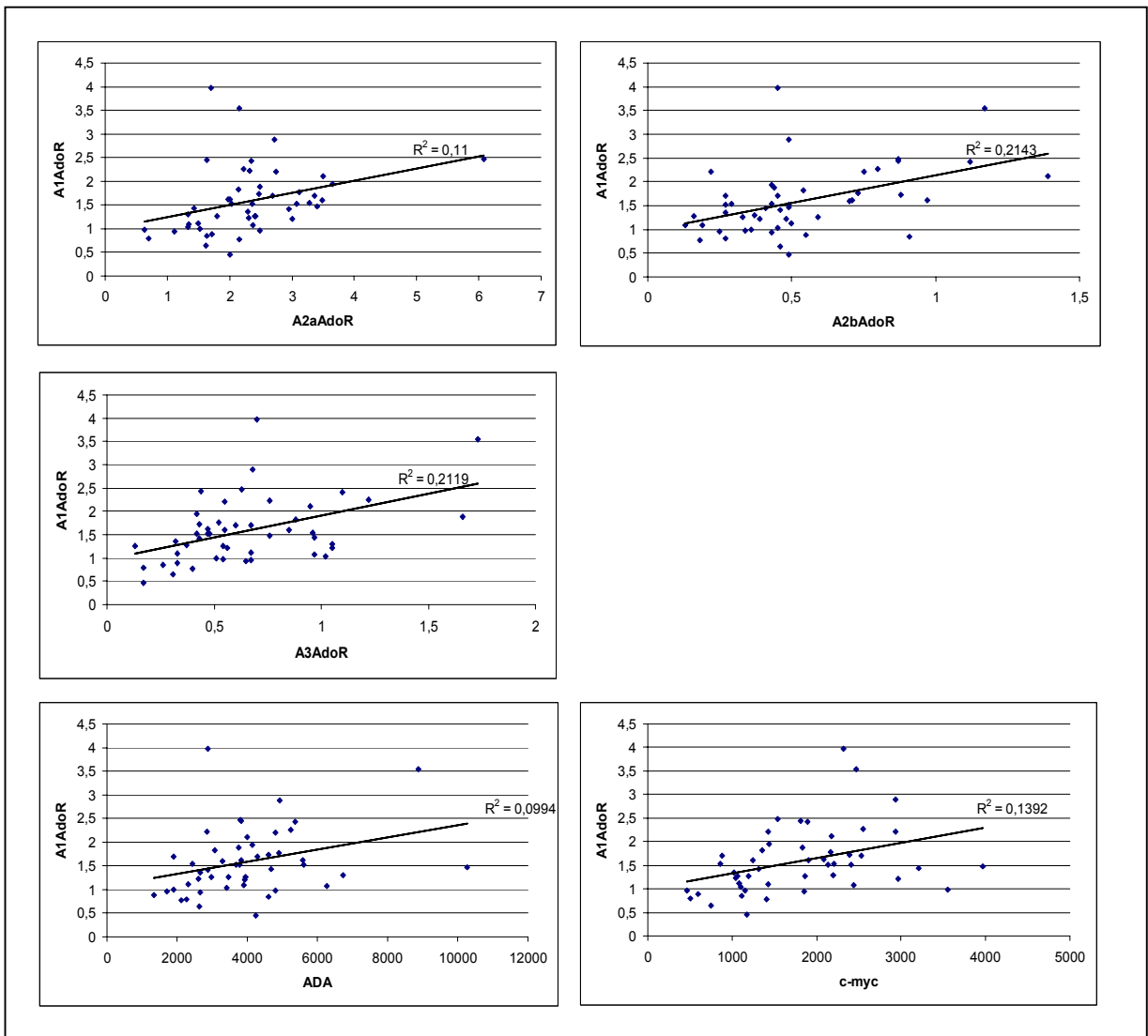


Abb. 58: Diagramm zur Korrelationsanalyse der A1AdoR-cDNS-Niveaus (A1AdoR) gegen die jeweiligen untersuchten Gene/Enzyme. ADA und c-myc sind aufgrund der Meßmethode gesondert zu betrachten. Ergebnisse der linearen Regression sind als Gerade dargestellt. Das Quadrat der Signifikanz dieser Regression (R^2) ist ebenfalls angegeben.

Tendenziell zeigt die A1AdoR-Transkription innerhalb der untersuchten Patienten-Gruppe eine positive Korrelation zu den anderen AdoR-Subtypen (insbesondere A2bAdoR und A3AdoR; Abb. 58), sowie evtl. zur c-myc-Transkription und ähnelt damit den Korrelationsanalysen nach Pearson.

6.7.3.5 A2aAdoR

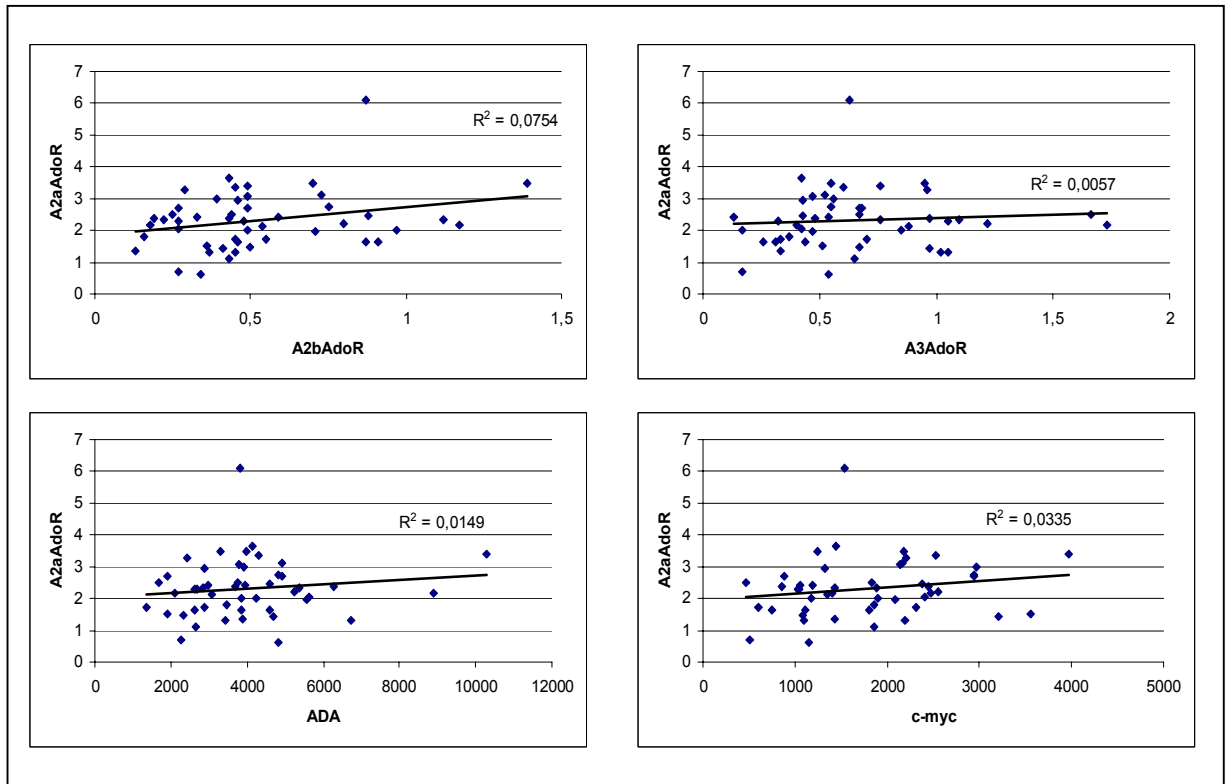


Abb. 59: Diagramm zur Korrelationsanalyse der A2aAdoR-cDNS-Niveaus (A2aAdoR) gegen die jeweiligen untersuchten Gene/Enzyme. ADA und c-myc sind aufgrund der Meßmethode gesondert zu betrachten. Ergebnisse der linearen Regression sind als Gerade dargestellt. Das Quadrat der Signifikanz dieser Regression (R^2) ist ebenfalls angegeben.

Bezüglich der A2AdoR-cDNS-Niveaus konnten keine bedeutenden Korrelationen, außer den bereits bekannten (A1AdoR, Leukozytenanzahl) festgestellt werden ($R^2 < 0.075$; Abb. 59).

6.7.3.6 A2bAdoR

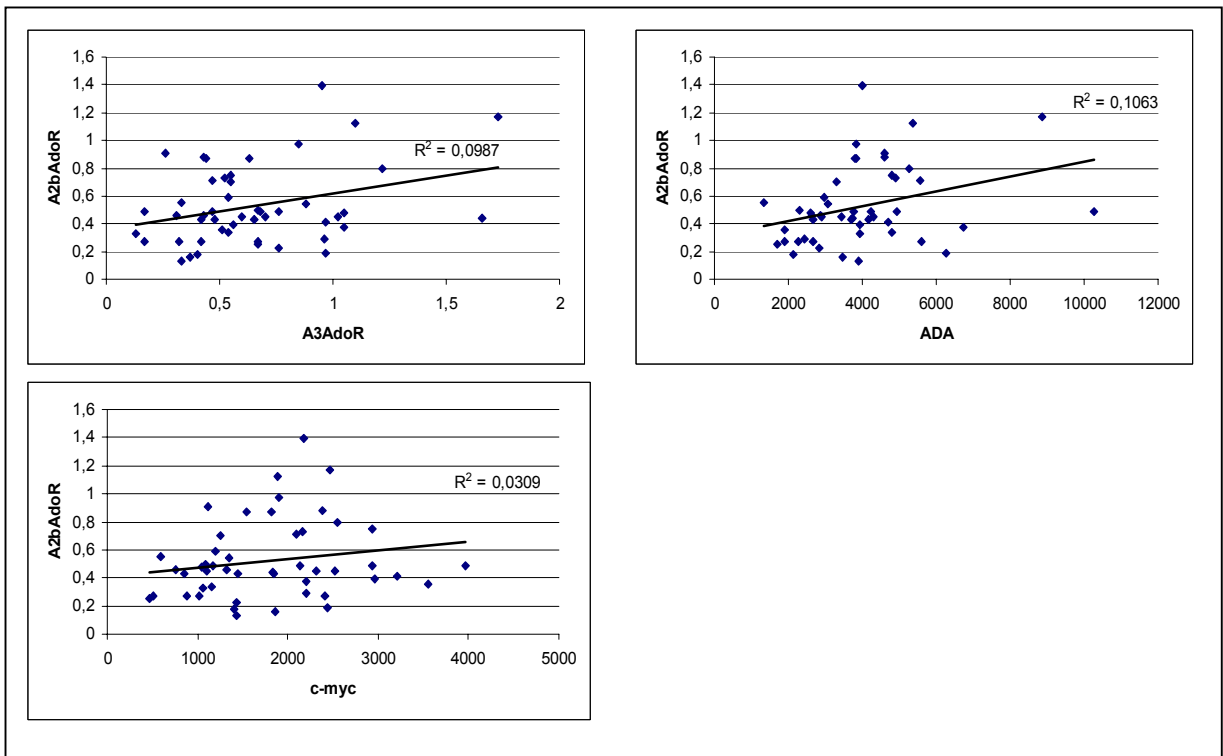


Abb. 60: Diagramm zur Korrelationsanalyse der A2bAdoR-cDNS-Niveaus (A2bAdoR) gegen die jeweiligen untersuchten Gene/Enzyme. ADA und c-myc sind aufgrund der Meßmethode gesondert zu betrachten. Ergebnisse der linearen Regression sind als Gerade dargestellt. Das Quadrat der Signifikanz dieser Regression (R^2) ist ebenfalls angegeben.

Leichte positive Korrelationen zum A2bAdoR-Niveau fand man, neben der bereits besprochenen zum A1AdoR-Niveau (Abb. 58), beim A3AdoR- wie auch beim ADA-cDNS-Niveau (Abb. 60) und entsprechen somit dem aus der Korrelationsanalyse nach Pearson gewonnenem Bild.

6.7.3.7 A3AdoR

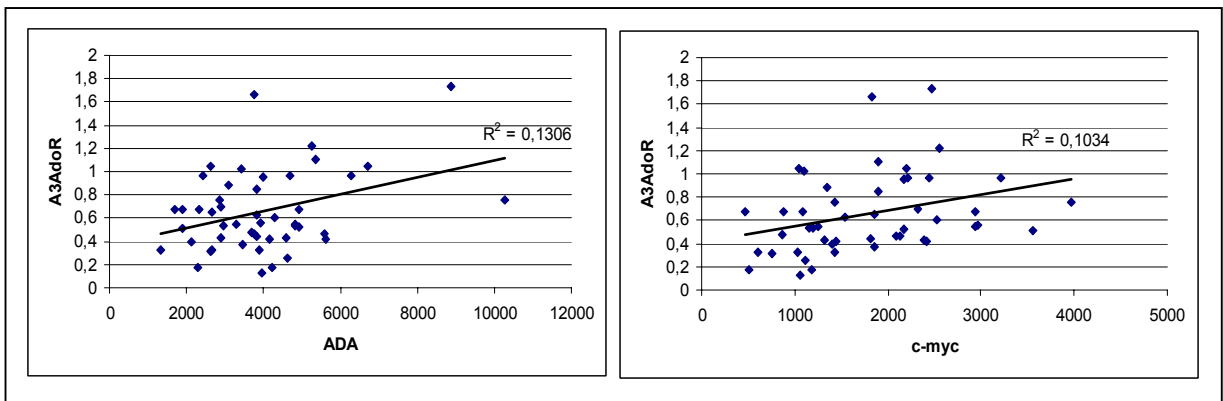


Abb. 61: Diagramm zur Korrelationsanalyse des A3AdoR-cDNS-Niveaus (A2bAdoR) gegen die Expression der ADA und c-myc-Gene. Ergebnisse der linearen Regression sind als Gerade dargestellt. Das Quadrat der Signifikanz dieser Regression (R^2) ist ebenfalls angegeben.

Eine leichte positive Korrelation mit den ADA- wie c-myc-Transkriptionsniveaus sind im Falle des A3AdoR-Niveaus, wie erwartet, zu erkennen (Abb. 61). Die Korrelationen zu den A1AdoR-, wie A2bAdoR-Niveaus wurden vorhergehend beschrieben (Abb.58-60).

6.7.3.8 Alter

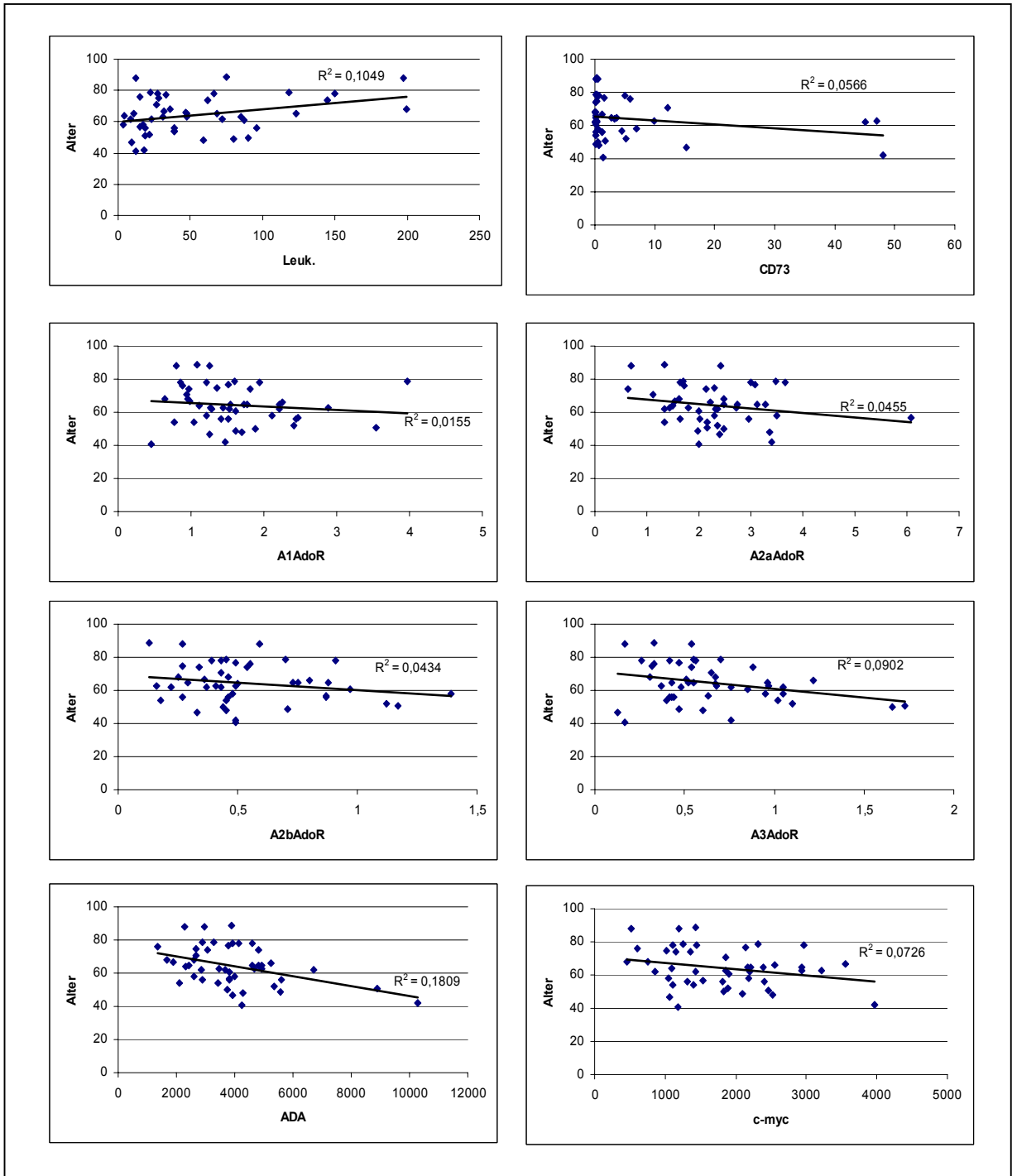


Abb. 62: Diagramm zur Korrelationsanalyse des Patientenalters gegen die jeweiligen untersuchten Gene/Enzyme. ADA und c-myc sind aufgrund der Meßmethode gesondert zu betrachten. Ergebnisse der linearen Regression sind als Gerade dargestellt. Das Quadrat der Signifikanz dieser Regression (R^2) ist ebenfalls angegeben.

Auswertung der Patientenergebnisse ergab eine leichte Zunahme der Leukozytenanzahl mit dem Alter, was mit fortschreitendem Krankheitsverlauf zu erklären ist. Lediglich im Falle des A3AdoR, der ADA und evtl. c-myc fand man eine korrelierende Abnahme der Expressionsniveaus mit zunehmendem Alter (Abb. 62).

6.7.4 Langfristige Änderungen der Expressionsniveaus bei Wiederholungsuntersuchungen.

In 4 Fällen wurden Patientinnen in einem Abstand von 5 Monaten bis 1,5 Jahren nochmals untersucht. Die Ergebnisse eines Vergleiches sollten Hinweise auf eine mögliche Modifikation der untersuchten Komponenten in progressiven oder remissiven Krankheitsverläufen geben.

CLL	5'N-Test	Alter	Binet	Leuk x10e ³	CD73	A1AdoR	A2aAdoR	A2bAdoR	A3AdoR	ADA	c-myc
C19	15.01.98	54	B	39	0,12	1,04	1,33	0,45	1,02	3424,62	1100,66
C35	19.11.98	54	B	39	0,24	0,77	2,15	0,18	0,4	2116,97	1403,4
C26	06.02.98	78	A	66,6	0,63	1,94	3,65	0,43	0,42	4154,9	1440,42
C36	05.02.99	79	A	118	0,41	3,97	1,7	0,45	0,7	2884,58	2315,33
C05	31.07.97	74	C	61,9	0,14	1,82	2,14	0,54	0,88	3082,21	1352,29
C28	13.02.98	74	C	145	0,19	0,97	0,63	0,34	0,54	4813,88	1155,19
C22	22.01.98	62	A	23,4	0,28	2,22	2,32	0,22	0,76	2849,98	1427,15
C43	27.05.99	63	A	30,9	0,31	1,27	1,8	0,16	0,37	3451,4	1858,08

Tab. 17: Übersicht über die Expressionsverteilung der untersuchten Gene/Enzymaktivitäten bei 4 wiederholt untersuchten Patientinnen. Änderungen der jeweiligen Expressionen bei der 2. Untersuchung wurden hervorgehoben (rot = Zunahme; blau = Abnahme) und mit der Leukozytenanzahl (Leuk x10e³) verglichen.

Alle 4 Patientinnen zeigten niedrige CD73-Aktivitätsraten, die sich zwischen den Untersuchungen kaum änderten. In 2 Fällen fand man einen deutlichen Anstieg in der Leukozytenanzahl (C26/C36 bzw. C05/C28). Insgesamt kann man durchaus eine Modulation der Expression innerhalb der untersuchten AdoR erkennen, was darauf hindeutet, daß eine aktive Regulation der Rezeptorexpression einen Selektionsvorteil für die malignen B-Lymphozyten darstellen könnte.

Besonders augenfällig ist die „Downregulation“ des A2aAdoR in den rasch expandierenden Populationen (C26/C36 bzw. C05/C28 und evtl. C22/C43), wogegen im Falle der nicht stark expandierenden eine erkennbare A2aAdoR-Hochregulation zu beobachten war (C19/C35).

Hinsichtlich der ADA und c-myc-Niveaus fand man ebenfalls Modulationen, jedoch keine eindeutigen Tendenzen bezüglich der Expansion der malignen B-Lymphozyten.

6.7.5 Immunphänotypisierung der Patientenproben

Die Immunphänotypisierung erfolgte von Seiten der Klinikum Innenstadt her und wurden zusätzlich in der folgenden Korrelationsanalyse verwendet (Tab.18).

	CD5	CD3	CD4	CD8	CD19	CD22	CD23	CD5/CD19
ALTER	-0,132	-0,184	-0,182	-0,143	0,051	0,005	-0,089	0,141
Leuk x10e3	-,371(*)	-0,229	-0,117	-,373(*)	0,042	0,03	0,007	0,015
CD73	0,101	,468(**)	,466(**)	0,291	-,332(*)	-0,058	-0,115	-0,199
A1ADOR	0,143	-0,263	-0,305	-0,175	0,251	0,102	0,169	0,212
A2AADOR	0,214	0,05	-0,015	0,115	0,096	-0,013	0,037	0,025
A2BADOR	0,194	-0,153	-0,146	-0,124	0,161	0,06	-0,023	0,189
A3ADOR	-0,147	-0,128	-0,22	0,044	0,089	,358(*)	0,015	-0,154
ADA	0,132	0,093	0,137	0,025	-0,065	-0,057	-0,019	0,007
C-MYC	0,214	-0,104	-0,131	-0,003	0,141	-0,057	0,172	0,159
CD5	1	-0,101	-0,08	-0,151	0,305	-0,222	,508(**)	,830(**)
CD3	-0,101	1	,957(**)	,871(**)	-,943(**)	-0,067	-,660(**)	-,640(**)
CD4	-0,08	,957(**)	1	,704(**)	-,898(**)	-0,164	-,584(**)	-,600(**)
CD8	-0,151	,871(**)	,704(**)	1	-,865(**)	0,085	-,691(**)	-,605(**)
CD19	0,305	-,943(**)	-,898(**)	-,865(**)	1	0,098	,727(**)	,712(**)
CD22	-0,222	-0,067	-0,164	0,085	0,098	1	-0,154	-0,221
CD23	,508(**)	-,660(**)	-,584(**)	-,691(**)	,727(**)	-0,154	1	,682(**)
CD5/CD19	,830(**)	-,640(**)	-,600(**)	-,605(**)	,712(**)	-0,221	,682(**)	1

Tab. 18: Korrelationsanalyse verschiedener Oberflächenmarker (CD) mit den untersuchten Komponenten des AdoR-Signalweges.

B-CLL-Lymphozyten können anhand ihrer spezifischen Oberflächenmarker-Zusammensetzung (CD5⁺, CD19⁺, CD23⁺, CD22⁻) diagnostisch charakterisiert werden (Shaw *et al.* 1994). Normalerweise bildet in der CLL diese Population den Hauptanteil der Leukozytenfraktion und verdrängt meistens die T-Lymphozyten mit ihrer charakteristischen CD3⁺ (T-Zellrezeptor) und CD4⁺, CD8⁺-Expression (akzessorische Moleküle bei der MHC-Erkennung). Weitere Charakteristika der B-CLL-Lymphozyten sind CD23 (niedrigaffiner IgE-Rezeptor) und das Fehlen bestimmter Zelladhäsions-Moleküle (CD22; BL-CAM).

Innerhalb unserer Patientengruppe konnten zum Großteil die oben beschriebenen Charakteristika bestätigt und eine deutliche Erniedrigung der T-Lymphozyten-Population beobachtet werden (siehe auch 9.2; Tab. 21). Bezüglich des Alters konnten keine signifikanten Korrelationen mit den CD-Markern gefunden werden. Man fand eine negative Korrelation der cytotoxischen T-Zellpopulation (CD8-Marker) mit der Leukozytenanzahl und erstaunlicherweise auch mit dem B-Zellrezeptor (CD5). CD73-Aktivität war hauptsächlich mit der Präsenz der T-Helferzell-Population verbunden (CD3⁺, CD4⁺) und korrelierte negativ mit der akzessorischen Komponente des BCR-Signaltransduktionskomplexes CD19.

Innerhalb der AdoR-Gruppe fand man lediglich eine positive Korrelation des A3AdoR mit dem Zelladhäsions-Molekül CD22. Eine leichte, nicht signifikante negative Korrelation des A1AdoR zu CD-Markern der T-Zellpopulation (CD3, CD4, CD8) und eine nicht signifikante Präferenz zu B-Zellmarkern (CD5, CD19, CD23) konnte beobachtet werden. Bezüglich der ADA- und c-myc-Niveaus konnten keine signifikanten Beziehungen gefunden werden.

7 Diskussion

7.1 Etablierung der semiquantitativen RT-PCR

Semiquantitative RT-PCR kann eine Alternative oder Ergänzung zu Blotting-Methoden, wie dem Northern Blot, bieten. Durch Zugabe des heterologen Standards und Abgleich mit einem bekannten Mengenstandard ist diese Methode durchaus in der Lage, geringe Unterschiede in den Expressionsniveaus der untersuchten Gene aufzulösen und aufgrund der sukzessiven Amplifikation in den PCR-Zyklen auch geringe Mengen an mRNA in bedeutend kleinerem Zeitrahmen nachzuweisen. Neue Nachweismethoden, wie der „Light Cycler“ (Roche) bieten zwar von der Handhabung und Auswertung Vorteile, dürften aber bei der Automatisierung des mRNA-Nachweises, z.B. in der genetischen Diagnostik, entsprechend höhere Anschaffungs- und Betriebskosten nach sich ziehen. Zudem ist bei vergleichbarer Genauigkeit eine deutlich verringerte Gesamtprobenanzahl pro Ansatz testbar.

Für die bis dato bekannten AdoR-Subtypen konnte in dieser Arbeit, trotz hoher Gensequenzhomologien (bis zu 60%, wobei α -helikale Bereiche generell höhere Homologien zeigten (Linden 1994), spezifische Primerpaare hergestellt werden. Die Spezifität zur mRNA war durch intronüberspannende Amplifikate gewährleistet und es konnte nachgewiesen werden, daß keine chromosomalen Nebenprodukte die zu erwartenden Amplifikate verunreinigten. Unspezifische Nebenprodukte konnten in den meisten Fällen mit Negativproben der transfizierten CHO-Zelllinien ausgeschlossen werden, da diese Zelllinien keine AdoR-Subtypen exprimieren (Klotz *et al.* 1998). Restriktionsverdau der PCR-Amplifikate ergaben in allen Fällen das zu erwartende Fragmentmuster.

In fast allen Fällen konnte eine gleichmäßige Amplifikation des heterologen Standards mit der Produktbande bestätigt werden. Lediglich im Falle des A3AdoR-Systems zeigte sich eine verspätet einsetzende Amplifikation der Produktbande (6.3.3.1; Abb. 37). Dennoch sollte dieses System ebenfalls funktionieren, da sämtliche Ansätze unter gleichen Bedingungen amplifiziert wurden.

Generell zeigte die Auswertung der Konzentrationsreihen die Empfindlichkeit der Methode, in denen noch Unterschiede von ca. 40% in der Ausgangskonzentration der zu untersuchenden Transkripte einen deutlichen Unterschied in der Signalstärke ergab (siehe 6.3.3.2). Gleichzeitig zeigte sich aber auch, daß schon geringe Fehler, vermutlich in der Probenvorbereitung zu starken Abweichungen in der zu erwartenden Signalstärke führen (Abb. 39), weshalb immer Mehrfachansätze für jede Probe amplifiziert wurden. Auch waren die Signale nicht vollständig proportional zur Ausgangsmenge, weshalb in dieser Arbeit nur qualitativ Vergleiche gezogen wurden und nicht auf absolute Mengen zurückgeschlossen wurden, wie es mit dieser Methode durchaus möglich sein sollte (Kretzler *et al.* 1998).

7.2 Darstellung der Fusionskonstrukte

Für alle 4 Subtypen konnten C-terminale EGFP-Fusionskonstrukte unter einem CMV-Promotor erstellt werden. Per PCR modifizierte Adapter wurden sequenziert und alle Komponenten innerhalb des finalen Konstruktes per Restriktionsverdau oder RT-PCR nachgewiesen. Die richtige Reihenfolge der bis zu 3 Ligationskomponenten in dem Konstrukt sollte in den meisten Fällen durch Verwendung selektiver „sticky-end“-Schnittstellen gewährleistet sein. Zudem konnte die cDNA aller Konstrukte in HeLa-Zelllinien über ihren EGFP-Anhang nachgewiesen werden (6.2.1.2; Abb.27). Die

Verteilung der Fluoreszenz zeigte in allen Fällen eine membranorientierte Lokalisation der Fusionsproteine, was auf einen erfolgreichen Transport und damit posttranslationale Prozessierung hindeutet (Abb. 28). Innerhalb der CHO-Zelllinie konnte die mRNA der inhibitorischen EGFP-Fusionskonstrukte sowohl bezüglich ihres EGFP-Anhanges (6.2.2.2; Abb. 30), wie auch in die Ligationskomponenten überspannenden Amplifikaten nachgewiesen werden (6.1.3.3; Abb. 22 und 6.1.4.2; Abb. 25b). Eine Funktionalität des A1AdoR konnte mit der erfolgreichen Internalisierung nach Stimulation mit R-PIA bestätigt werden, da dieser Mechanismus abhängig von der erfolgreichen Signaltransduktion über den A1AdoR ist (Saura *et al.* 1998).

7.3 Transfektanten und Modellsysteme

7.3.1 HeLa-Transfektanten

Die HeLa-Zelllinie wurde aufgrund ihrer guten Transfizierbarkeit als adhärente Zelllinie ausgewählt. Diese Cervix-Carcinom-Linie besitzt hohe Niveaus an A2bAdoR, A1AdoR, sowie etwas an A2aAdoR und A3AdoR, jedoch sollte mit dem stark exprimierende CMV-Promotor des Konstruktes ein beobachtbarer Anstieg der jeweiligen Niveaus zu sehen sein. Interessanterweise fand man aber in den Transfektanten keine großen Veränderungen der Niveaus gegenüber der mitgeführten Kontrolle, die den nackten EGFP-Vektor exprimierte (EGFP-HeLa; siehe 6.4.1 Tab. 8). Da man in allen 4 Transfektanten jedoch eine oberflächenorientierte Expression der Konstrukte und auch mRNA des EGFP-Anhangs nachweisen konnte, sollte ein intaktes Fusionskonstrukt mit entsprechender N-terminaler Signalsequenz vorhanden sein. Demzufolge könnten posttranslationale Regulationsmechanismen eine drastische Erhöhung des Membrananteils des transfizierten Konstruktes verhindern, die mit einer eventuellen „Downregulation“ des nativen Proteins einhergehen kann, zumal Membranproteine oftmals bei Überexpression toxisch wirken. Dies kann durchaus auch zur Selektion niedrig exprimierender Klone geführt haben.

Generell erhielt man mit den A1/A3AdoR-Konstrukten relativ hoch exprimierende Klone (u.a. Abb. 28). Im Falle des A3AdoR-Konstruktes (A3HeLa-EGFP) konnte eine deutliche Verlangsamung des Wachstums beobachtet werden, was einen doch deutlichen physiologischen Effekt in der Transfektante darstellt. Es ist bekannt, daß gerade der A3AdoR regulatorisch auf den Zellzyklus wirken kann (Brambilla *et al.* 2000); (Fishman *et al.* 2000).

Die excitatorischen AdoR-Transfektanten (A2a/A2bAdoRHeLa-EGFP) zeigten dagegen nur relativ geringe Expression der Konstrukte. Gerade Transfektion mit dem A2aAdoR gestaltete sich als schwierig. Hoch exprimierende Klone rundeten sich meistens ab und lysierten in den ersten Tagen nach der Transfektion. Ähnliche, jedoch nicht so ausgeprägte Tendenzen fand man auch bei den A2bAdoR-Transfektanten. Dies könnte zum einem mit dem ohnehin schon hohen Expressionsniveau in der HeLa-Zelllinie zusammenhängen, aber auch mit mitogenen Aspekten zu tun haben. A2bAdoR induzieren oftmals Apoptosis in diversen Zelltypen (Peyot *et al.* 2000) und regulieren das Zellwachstum (Dubey *et al.* 1998). Auch deutet die weitläufige Verteilung mit geringen Niveaus auf eine allgemeine Funktion dieses Subtypes bei der Aufrechterhaltung der Zellfunktion hin. Hinzu kommt noch, daß HeLa eher eine schnellwachsende Zelllinie ist, so daß mitogene Signale, wie cAMP, durchaus einen Effekt auf das Zellwachstum haben können (Andrisani 1999). Zumal übermäßige Wachstumsinduktion die apoptotische Antwort initiieren kann, ist es durchaus

möglich, daß zusätzliche Induktion des Ado-Signalweges und anschließende Erhöhung des cAMP-Niveaus die Apoptosis herbeiführen können (Lerner *et al.* 2000). Zudem sind im allgemeinen Verschaltungen der AdoR mit dem Apoptose-Mechanismus innerhalb der Caspasen-Kette bekannt geworden (Blom *et al.* 1999); (Shneyvays *et al.* 2000); (Sampath und Plunkett 2000).

Dies könnte durchaus auch ein Grund für die höhere Transfizierbarkeit der inhibitorischen AdoR sein, die Adenylylcyclase inhibieren und über den Ca^{2+} /Inositol-Signalweg antiinflammatorische und antiapoptotische Signale modulieren (Yano *et al.* 1998) können. Hierbei sei u.a. die Modulation der Proteinkinase B/AKT (Gao *et al.* 2001), wie auch Mitglieder der BCL2-Familie (BCL2/BCL-X_L/Bax) (Srivastava *et al.* 1999); (Abbraccio *et al.* 1997) zu erwähnen.

Vergleicht man nun die jeweiligen cDNS-Niveaus der AdoR-Subtypen in allen Transfektanten, so lassen sich durchaus Modifikationen der Niveaus im Vergleich zur Kontrolllinie EGFP-HeLa feststellen (Tab. 8). Es ist wohl anzunehmen, daß mit Zunahme des AdoR-Niveaus eines Subtypes eine stärkere Aktivierung dieses Subtypes durch im Zellmedium vorhandenes Ado erfolgt. A1AdoR-Transfektanten zeigten einen leichten Anstieg der A2bAdoR-Expression, sowie eine Abnahme des A2aAdoR-Niveaus. Dies könnte in der Tat auf gegenseitige Einflußnahme der AdoR untereinander zurückzuführen sein. Gerade von A1AdoR und A2aAdoR sind Kreuzregulationen im ZNS bekannt (Dixon *et al.* 1997). Aktivierung des Ca^{2+} /Inositol-Signalweges durch inhibitorische AdoR kann zur Aktivierung oder Inhibierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie NF κ B oder AP-1 führen (Li *et al.* 2000), die auch die Transkription diverser AdoR-Subtypen regulieren (Nie *et al.* 1998); (Atkinson *et al.* 1997). Ein deutlicher Anstieg des A3AdoR-Niveaus in der A1AdoR-Transfektante ist ebenso beobachtbar. Schon seit längerem ist eine enge Kopplung dieser beiden AdoR in der ischämischen Prekonditionierung des Gehirns (von Lubitz 1999) oder des Herzens (de Jong *et al.* 2000) bekannt und ihre Regulation entscheidet gerade im ersten Falle über Reparatur oder Apoptosis neuronalen Gewebes (von Lubitz 1999). Zudem können beide Rezeptoren über GRK's reguliert werden (Nie *et al.* 1997); (Ferguson *et al.* 2000). Insofern könnte eine gekoppelte Regulation der Transkription durchaus eine zusätzliche Rolle, gerade im Falle von möglichen Langzeitwirkungen, spielen, zudem der A3AdoR auch den A1AdoR direkt desensibilisieren kann (Dunwiddie *et al.* 1997).

Transfektion der HeLa-Zelllinie mit dem A2aAdoR-Konstrukt zeigte eine leichte Abnahme des A1AdoR-Niveaus, sowie eine Abnahme des A3AdoR-Niveaus. Im ersten Falle scheint dies wiederum auf eine mögliche Kreuzreaktion dieser beiden AdoR-Subtypen hinzudeuten. Unterstützt wird dies auch durch die Tatsache, daß der A2aAdoR regulierend auf den A1AdoR wirken kann (Dixon *et al.* 1997). Auch der A2aAdoR und der A3AdoR sind in diversen Zelltypen antagonistisch verschaltet und regulieren z.B. die Degranulation der Mastzellen (Hannon *et al.* 1995); (Fenster *et al.* 2000) oder die Aktivierung der Monozyten (Hasko *et al.* 2000); (Sajjadi *et al.* 1996). Gerade im Hinblick auf inflammatorische Antworten könnte eine Modulation der Expressionsniveaus dieser beiden Subtypen auch längerfristig eine Rolle spielen. Daß AdoR langfristig reguliert werden können, ist z.B. bei der auf der „Long term potentiation“ beruhenden Gedächtnisbildung bekannt (Costenla *et al.* 2001); (de Jong *et al.* 2000).

Bezüglich der A2bAdoR-Transfektante konnte ein leichter Anstieg des A1AdoR-Niveaus verzeichnet werden. Das spiegelt den umgekehrten Effekt wie bei der A1AdoR-Transfektante. Eine mögliche Erklärung dieser gegenseitigen Beeinflussung könnte mit einem Ausgleich wachstumsinhibierender und mitogener Signale über die Adenylylcyclase gegeben sein.

Deutliche Erhöhung des A3AdoR-Niveaus konnte ebenfalls festgestellt werden. Funktionell sind diese Rezeptoren z.B. kostimulatorisch in der Degranulation der Mastzellen verschaltet (Reeves *et al.* 1997), (Feoktistov und Biaggioni 1995), was eine mögliche gemeinsame Regulation implizieren könnte.

Innerhalb der A3AdoR-Transfektante konnte eine Zunahme des A2aAdoR- wie auch des A1AdoR-Niveaus festgestellt werden. Im ersten Fall erhärtet dies die zuvor in den anderen Transfektanten beobachteten Beziehungen der entsprechenden Subtypen. Die Erhöhung des A2aAdoR-Niveaus in der A3AdoR-Transfektante könnte wohl am ehesten mit einer Kompensation der wachstumsinhibierenden Signale des A3AdoR erklärt werden (Brambilla *et al.* 2000)

Induktion der Konstrukte erfolgte im Falle der excitatorischen AdoR mit dem Ado-Analogon NECA (6.4.2.1; Tab. 9a-c) und im Falle der inhibitorischen Subtypen mit R-PIA (6.4.2.2; Tab. 10a-c) für einen Zeitraum von einem Tag. Um eine stärkere Respons durch konstant erhöhtes cAMP-Niveau zu erhalten, wurde im ersten Fall der Phosphodiesterase-Hemmer Ro 20-1724 in alkoholischer Lösung zugegeben. Um etwaige Effekte der Alkoholzugabe abschätzen zu können, wurden ebenfalls Kontrollen mit Zugabe der entsprechenden Alkoholmenge gemacht, ebenso als Zusatz bei der Untersuchung der inhibitorischen Transfektanten. Im Allgemeinen konnte man eine deutliche Steigerung der cDNS-Menge der entsprechenden Subtypen nach einem Tag bei Zugabe von Ro 20-1724 feststellen, der deutlich höher lag, als der entsprechende Anstieg der Kontrollproben (EGFP-HeLa). Interessanterweise war in allen 4 Subtypen ein Anstieg der Niveaus nach NECA-Stimulierung feststellbar. Dies ist wahrscheinlich auf das erhöhte cAMP-Niveau der Zellen zurückführbar, was durchaus die Aktivierung relevanter Transkriptionsfaktoren nach sich ziehen kann (Atkinson *et al.* 1997). Hierbei fand man aber bei den A2bAdoR-Transfektanten nur einen geringen Anstieg, was wohl auch mit der ohnehin schon hohen Expression dieses Subtypes in der HeLa-Zelllinie und den oben erwähnten cytotoxischen Wirkungen zusammenhängen kann (Lerner *et al.* 2000).

Stimulierung mit R-PIA in den entsprechenden Transfektanten führte zu einer Erniedrigung der entsprechenden Niveaus, die ebenfalls deutlich größer gegenüber der Kontrollzelllinie ausfiel. Im Hinblick auf die zuvor erwähnte Hypothese, könnte dies mit der Inhibition der Adenylylcyclase zusammenhängen, was das cAMP-Niveau der Zelle erniedrigen würde. Auch könnte eine entsprechende Regulation auf der Aktivierung des Ca^{2+} /Inositol-Signalweges und einer damit verbundenen Änderung der Aktivität diverser Transkriptionsfaktoren basieren (Li *et al.* 2000); (Hemenway und Heitman 1999).

Interessanterweise findet man bei Zugabe von EtOH allein einen deutlichen Anstieg aller AdoR-Subtypen in allen Transfektanten, wobei der größte Effekt wohl in den A3AdoR-, A2bAdoR- und A1AdoR-Transfektanten zu beobachten war. Die beiden erstgenannten Klone zeigten dann auch eine extrem hohe Mortalität in der Kultur, wobei jedoch im Falle der Stimulierung mit Ro 20-1724 und NECA oder R-PIA keine so große Tendenz zum Absterben beobachtet werden konnte. Bekannt ist, daß Alkohol eine Erhöhung der Adenosinfreisetzung ins umgebende Medium (Fredholm und Wallman-Johansson 1996) und eine Erhöhung des cAMP-Niveaus bewirken kann (Pandey 1998). Es wäre durchaus möglich, daß Ethanol über den A3AdoR Einfluß auf NO- und Proteinkinase C vermittelte Signalwege nehmen kann (Miller und Hoffman 1994). Dies würde auch den hohen induzierten Anstieg der AdoR-Subtypen in der A3AdoR-, wie auch zum Teil der A1AdoR- und A2bAdoR-Transfektante erklären, die ja auch einen erhöhten A3AdoR-Anteil besitzen. Zumal ja diverse AdoR in der Wachstumsregulation, wie auch der Apoptosis involviert sind, könnte

dieser Alkohol-induzierte Anstieg der AdoR eventuell auch Bestandteil der apoptotischen Antwort sein (Slomiany *et al.* 1998).

7.3.2 CHO-Zelllinie

„Chinese Hamster Ovary-Zellen“ (CHO) zeichnen sich durch einen extrem schnellen Zellzyklus und eine gute Transfizierbarkeit aus. Überdies konnten in dieser Zelllinie keine mRNS der AdoR-Rezeptoren nachgewiesen werden (siehe auch 6.2.2.2; Abb. 30), was sich mit den bisherigen Erkenntnissen über diese Zelllinie deckt (Klotz *et al.* 1998). Transfektion dieser Linie mit den inhibitorischen AdoR ergaben eine starke Expression der Fusionskonstrukte hauptsächlich in der Zellmembran. Es konnten sowohl der EGFP-Anhang als auch AdoR-sequenzspezifische Abschnitte mittels RT-PCR nachgewiesen werden, wogegen die EGFP-Kontrolle im letzteren Falle keine Produkte ergab. Demzufolge ist eine erfolgreiche Expression dieser Subtypen in der CHO anzunehmen. Excitatorische AdoR-Subtypen zeigten sich schwierig zu transfizieren. Lediglich niedrig exprimierende Klone der A2aAdoR-Transfektanten wurden erhalten, aber zeigten einen hohen Anteil an apoptotischen Zellen. Dies könnte indirekt auf die hohe Teilungsrate in dieser Linie zurückzuführen sein, da derartige Zellen empfindlicher auf apoptotische, wie auch mitogene Signale reagieren. Eine enge Verschaltung der proliferativen Respons mit der Apoptosis ist schon seit einiger Zeit bekannt (Evan und Littlewood 1998), so daß durchaus eine AdoR-vermittelte Erhöhung des cAMP-Niveaus zu apoptotischen Antworten in der CHO-Linie führen könnte (Chen *et al.* 1998); (Lerner *et al.* 2000).

IN DDT₁MF-2 Muskelzellen konnte von Saura (Saura *et al.* 1998) gezeigt werden, daß Stimulierung des A1AdoR mit R-PIA zunächst zu einer „Clusterung“ der A1AdoR führte (t= 5-15 Minuten), dem eine allmähliche Internalisierung von ca. 60% aller oberflächenexprimierter A1AdoR ($t_{1/2}$ = 10h bzw. 3h, in Anwesenheit von extrazellulärer ADA) folgte. Induktionsexperimente mit der A1AdoR-Transfektante (6.2.2.3; Abb. 31/32) zeigten nach ca. 5 Minuten die Entstehung deutlicher Flecken in der Oberflächenfluoreszenz, die sich nach 20 Minuten bzw. 3h intensivierten. Spätestens nach einem Tag, aber auch bereits nach 3h fand man eine deutlich stärkere Präsenz dieser „Foci“ im Zellinneren, was wohl am ehesten mit einer Internalisierung des Rezeptors zu erklären ist. Die etwas schnellere Respons in der CHO-Zelllinie ist wohl eher auf die erhöhten A1AdoR-Niveaus und weniger auf erhöhte ADA-Präsenz auf der Zelloberfläche zurückzuführen. Zudem könnte der schnellere Zellzyklus Auswirkungen auf die diversen Regulationsmechanismen der A1AdoR haben. Auch die A3AdoR-Transfektante zeigte sich funktionell aktiv. Wie bereits in der HeLa-Linie verlangsamte die Expression des A3AdoR die Teilungsrate deutlich (Daten nicht gezeigt).

7.3.3 Raji-Zelllinie

Die Raji-Zelllinie stellt eine lymphoblastoide B-Zelllinie dar, die sich durch eine hohe A2aAdoR-Expression auszeichnet. Dieser Rezeptor ist generell in Zellen des Immunsystems stark repräsentiert und vermittelt wachstums- und differenzierungsrelevante (Apasov *et al.* 2000), wie auch immunmodulatorische Signale (Spychala 2000). Wiederum fand man bei Stimulierung mit NECA nach einem Tag eine deutliche Erhöhung der cDNS-Niveaus aller AdoR-Subtypen in den Proben mit inhibierter Phosphodiesterase (RoN; 6.5; Tab. 11), wobei jedoch der größte Effekt das A2aAdoR-Niveau betraf. Da NECA ein relativ unspezifischer AdoR-Agonist ist,

kann dieser Anstieg auf zweierlei Effekten beruhen: 1. Signalvermittlung über die stimulatorischen AdoR wird wohl hauptsächlich über den A2aAdoR erfolgen und eine Erhöhung des cAMP-Niveaus bewirken, das wiederum diverse AdoR-relevante Transkriptionsfaktoren regulieren könnte. 2. NECA stimuliert ebenso A3AdoR und kann damit auch Phospholipase C und den anschließenden Signalapparat aktivieren. Da enge funktionelle Interaktionen zwischen A3AdoR und A2aAdoR bekannt sind (Fenster *et al.* 2000), besteht auch die Möglichkeit, daß diese Rezeptoren sich gegenseitig in der Transkriptionsaktivität oder Stabilität der mRNS ihrer Gene beeinflussen.

Wiederum, wie bei den A2bAdoR- bzw. A3AdoR-Transfektanten der HeLa-Linie, findet man bei Zugabe von Alkohol einen Anstieg der AdoR-Niveaus in den untersuchten Proben. Besonders deutlich war dies in den A2bAdoR- und A3AdoR-cDNS-Niveaus zu erkennen. Die Zellen zeigten sich im Allgemeinen weniger anfällig gegen die Behandlung mit Alkohol und man fand deutliche geringere Mengen an absterbenden Zellen als in der A2bAdoR-HeLa-Transfektante. Demgemäß, um o.g. Hypothese wieder aufzunehmen, könnte man annehmen, daß aufgrund etwas geringerer A3AdoR-Niveaus in der Raji-Linie eine geringere alkoholvermittelte Induktion der Apoptosis stattfinden könnte. Der Anstieg des A2bAdoR könnte auf die deutlich niedrigeren Ausgangsniveaus der Raji-Linie gegenüber der HeLa-Zelllinie zurückzuführen sein, wobei wohl dieser Effekt wiederum auf den alkoholvermittelten Ado-Anstieg in der Zellumgebung zurückzuführen sein dürfte. Eventuell erfolgt wiederum eine Aktivierung des Ca^{2+} /Inositol-Signalweges mit anschließender Aktivierung relevanter Transkriptionsfaktoren wie NF κ B (Steffan *et al.* 1995).

Die Raji-Zelllinie war eines der untersuchten Zellsysteme, das aufgrund seiner morphologischen Eigenschaften indirekt Rückschlüsse auf die Situation der AdoR in der CLL geben könnte.

7.3.4 493-6-Zelllinie

Auch die 493-6-Linie entstammt einer lymphoblastoiden B-Zelllinie, bei der aufgrund vorangegangener Transfektionsschritte mit induzierbaren Vektoren die Modulation zweier mitogener Signale, c-myc und EBNA2, möglich war (Pajic *et al.* 2000). Northern Blot Analyse der Proben erbrachte eine deutliche Präsenz des A2aAdoR, die sich, abhängig vom Aktivierungszustand der beiden Mitogene, änderte (siehe 6.6.1.2; Abb. 51). Induktion der Zelllinie in einem Zeitraum von maximal 2 Tagen mit Tetracyclin oder β -Östradiol ergab 4, bezüglich ihrer Proliferationsgeschwindigkeit unterschiedliche Zustände. Den größten Effekt zeigte die Abschaltung des EBNA2-Mitogens in Abwesenheit einer c-myc-Transkription (493-6 2n4; Abb. 49a), das einen großen Anstieg des A2aAdoR-Niveaus verursachte. Abschaltung des EBNA2-Mitogens in Anwesenheit von c-myc (493-6 1n3) zeigte zwar auch einen Effekt auf das A2aAdoR-Niveau, blieb aber deutlich hinter dem erst genannten Effekt zurück (Abb. 48a). Ebenfalls zeigten die CD73-mRNS-Niveaus ein entsprechendes Verhalten bei der Abschaltung der Mitogene. Dieser Effekt ließ sich zudem bei der in diesem Labor parallel durchgeführten Untersuchung der CD73-Enzymaktivität beobachten (Gutensohn, unveröffentlichte Ergebnisse), was auf einen hauptsächlich transkriptionellen Regulationsmechanismus der beteiligten Komponenten hindeutet. Demzufolge scheinen verminderte Proliferationstendenzen eine Hochregulation des A2aAdoR in dieser Zelllinie zu fördern. Der gleichzeitig stattfindende Anstieg der CD73-mRNS und CD73-Aktivität würde insofern Sinn machen, wenn damit durch erhöhte Bereitstellung des Substrates und Aktivierung von A2aAdoR mitogene Signale generiert werden. Höchstwahrscheinlich dürfte eine Ado-vermittelte Erhöhung des cAMP-

Niveaus die Überlebensfähigkeit der nur noch wenig proliferierenden Zustände gewährleisten, wie man auch aus den nach 5-minütiger NECA-Stimulation der 4 Zustände gemessenen cAMP-Niveaus (6.6.2; Abb. 52) oder dem zeitlichen Verlauf der Inhibition der beiden Mitogene (493-6 1n4; Abb. 53) rückschließen kann. Daß es gegenseitige Regulationen zwischen AdoR und CD73 gibt, ist z.B. aus der A2bAdoR-vermittelten Aktivierung einer endothelen Barriere in inflammatorischen Prozessen bekannt, bei der die Aktivierung des A2bAdoR die Transkription der CD73 stimuliert (Naravula *et al.* 2000). Generell zeigt die CD73 in ihrer Promotorregion Bindungsstellen für NF κ B, sowie SP1, welche durch ebenfalls über Ado stimulierbare Signalwege reguliert werden können (Hansen *et al.* 1995). Überdies kann EBNA2 über die Noch-Signalkaskade die NF κ B-Aktivität modulieren (Strobl *et al.* 1997). Interessant wäre auch in diesem Zusammenhang, inwieweit die ADA als substrat-verarbeitendes Enzym hier einen Einfluß hat. Schon früh wurden Tendenzen in diversen Zelltypen beobachtet, in denen die CD73 und die ADA-Expression konträr reguliert wurden (Resta *et al.* 1998). Northern Blots der 4 Zustände der 493-6 konnten leider kein eindeutiges Ergebnis liefern, jedoch zeigte sich in den meisten Versuchen eine Abnahme der ADA-mRNS.

Mittels der semiquantitativen RT-PCR konnten alle 4 Rezeptorsubtypen identifiziert werden, wobei jedoch der A2aAdoR mit Abstand die höchste Präsenz zeigte (6.6.1; Abb. 47a).

Innerhalb der 4 Zustände konnte wiederum der mit Abschaltung des EBNA2-Mitogens einhergehende Anstieg des A2aAdoR-, wie auch des CD73-cDNS-Niveaus beobachtet werden (Abb. 47a/b). Ebenso fand man die bereits beim Northern Blot gefundene lediglich leichte Zunahme der entsprechenden Niveaus bei der Abschaltung des EBNA2-Mitogens in Anwesenheit von c-myc (Abb. 48a/b).

Die cDNS-Niveaus der anderen AdoR-Subtypen änderten sich nicht nennenswert. Im Falle des ADA-Transkriptes wurde in den meisten Fällen eine leichte Abnahme mit sukzessiver Abschaltung der Mitogene gefunden (Abb. 48b). Lediglich bei der Abschaltung der EBNA2-Expression mit abwesendem c-myc kam es oftmals zu einem leichten Anstieg der ADA-Niveaus (Abb. 49b). Verfolgte man den zeitlichen Ablauf der jeweiligen Inhibierung des EBNA2-Mitogens in An- oder Abwesenheit von c-myc (Abb. 48/49), so konnte nach ca. 3-6 Stunden ein entsprechender Effekt in den relevanten cDNS-Niveaus festgestellt werden, was auf einen doch spezifischen transkriptionsregulierenden Effekt hindeutet. Deutlich zeigte sich auch der weitaus stärkere Einfluß von EBNA2 auf die A2aAdoR- und CD73-Niveaus in Abwesenheit von c-myc, wogegen man bei angeschalteter c-myc-Transkription nur leichte Effekte beobachtete.

Demzufolge scheint vor allem c-myc eine deutliche Rolle bei der Regulation der untersuchten Komponenten in diesem System zu spielen.

Abschließend lassen sich durchaus einige kooperative Effekte der AdoR-Subtypen untereinander in diesen 3 Zelllinien erkennen. Zum einen führt Expression einzelner Subtypkonstrukte zu einer Veränderung der cDNS-Niveaus der anderen Subtypen. Induktion mit AdoR-Agonisten führte ebenfalls zu einer deutlichen Änderung des AdoR-mRNS-Gehaltes der untersuchten Kulturen und läßt sich eventuell mit „Feedback“-Mechanismen in den nachgeschalteten Signalwegen erklären. Alkohol zeigte eine besonders stimulierende Wirkung auf die cDNS-Niveaus aller Subtypen und könnte auf eine Hochregulation und Beteiligung der AdoR an der Apoptosis hindeuten (Slomiany *et al.* 1998). In B-lymphoblastoiden Zelllinien fand man eine starke Präsenz des A2aAdoR, der eine wichtige Rolle in der Proliferation und Apoptosis dieser Linien spielt und damit auch die Rolle des A2aAdoR in normalen B-Lymphozyten widerspiegelt (Huang *et al.* 1997); (Lerner *et al.* 2000). Möglicherweise

bilden die Komponenten des Ado-Signalweges in der 493-6-Zelllinie, A2aAdoR, CD73 und ADA, ein komplexes Netzwerk wechselseitiger Beziehungen, das durch mitogene Signale, wie c-myc und EBNA2, moduliert werden kann. Ähnliche Verhältnisse sollten sich auch in Lymphomen, wie z.B. der CLL, wiederfinden.

7.4 Klinische Studie an CLL-Patienten

Die chronisch lymphatische Leukämie ist gekennzeichnet durch eine allmähliche Akkumulation von relativ undifferenzierten B-Lymphozyten, die kaum proliferieren und in der G_{0/1}-Phase ruhen (Meinhardt *et al.* 1999). In den meisten Fällen findet man eine stark erniedrigte CD73-Aktivität (Rosi *et al.* 1998), was auf einige Modulationen der AdoR-Respons hindeuten könnte.

48 CLL-Patienten konnten im Rahmen einer klinischen Studie auf die cDNS der meisten Komponenten des Ado-Signalweges untersucht und mit einer Kontrollgruppe von 10 Personen verglichen werden. Gleichzeitig wurde in unserem Labor die Enzymaktivität der CD73 in den Patientenproben gemessen, die ebenfalls in die Auswertung einfließen (Gutensohn unveröffentlichte Ergebnisse).

Ein erster Vergleich der Patientendaten mit denen der Kontrollgruppe ergab bereits einige Unterschiede in der Subtypverteilung der AdoR (siehe 6.7.2 Tab. 14). Oft fand man deutliche Amplifikationen oder Erniedrigungen der cDNS-Niveaus der diversen AdoR-Subtypen, wie auch Modulationen der ADA und c-myc-Niveaus. Die letzteren beiden sind aber aufgrund der etwas ungenaueren Meßmethode (reine densitometrische Auswertung des Signales ohne heterologen Standard) als nicht genauso aussagekräftig zu bewerten.

Korrelationsanalysen der beiden Testgruppen ergaben mehrfache Zusammenhänge der verschiedenen untersuchten Komponenten, die von denen in der gesunden Kontrollgruppe abweichen und somit durchaus über die Morphologie der malignen CLL-Population etwas aussagen können. Schon früh zeigte sich eine deutliche proapoptotische Wirkung von Purinen in der CLL, was zur Entwicklung therapeutisch wirksamer Ado-Analoga, wie dem 2-Chloro-Adenosin, führte, das über A2aAdoR-vermittelte Signale die apoptotische Antwort in B-CLL-Lymphozyten auslöst (Barbieri *et al.* 1998). Theophyllin, ein ebenfalls oft eingesetztes Medikament wirkt durch Inhibition der Phosphodiesterase ebenfalls über diesen Signalweg (Mentz *et al.* 1999).

7.4.1 Modulation der CD73-Aktivitäten in den Patientenproben

Wie bereits erwähnt zeigen die B-CLL-Klone aufgrund ihres undifferenzierten Status nur geringe CD73-Aktivität, wie man auch in der untersuchten Patientengruppe feststellen konnte. Bereits früher konnte in diesem Labor eine Zunahme der Gesamt-Leukozytenanzahl mit abnehmender CD73-Aktivität festgestellt werden (Gutensohn, unveröffentlichte Ergebnisse), die sich auch in dieser Patientengruppe widerspiegelte. Proben mit weniger als 25000 Leukozyten/ μ l zeigten relativ stark negativ korrelierende CD73-Aktivitäten und Patienten mit mehr als 25000 Leukozyten/ μ l besaßen so gut wie keine CD73-Aktivität mehr (Abb. 54). Atypisch erhöhte CD73-Aktivität konnte in Zusammenhang mit noch vorhandenen Populationen an T-Lymphozyten gebracht werden (siehe 6.7.5; Tab. 18) und korrelierte im Allgemeinen negativ mit dem B-CLL-Lymphozyten-spezifischen Marker CD19 (siehe 6.7.5; Tab. 18), was auf eine generell erniedrigte Aktivität dieser Population hindeutet. Korrelationsanalyse der Patientendaten erbrachte leider nur geringe negative Korrelationen evtl. noch zu den A1AdoR bzw. A2aAdoR-Subtypen. Demzufolge konnten die

Ergebnisse der 493-6-Zelllinie nicht unbedingt bestätigt werden. Da aber zum einen die CD73-Aktivität in den Patientenproben krankheitsbedingt ohnehin niedriger lagen, könnte diese schwache Korrelation auch statistische Gründe haben. Überdies ist bekannt, daß in der CLL sowohl c-myc (Bentz *et al.* 1995), als auch EBNA2 (Peng und Lundgren 1993) bzw. NFκB (Schuh *et al.* 1996) eine starke Aktivierung erfahren kann, was somit ebenfalls Einfluß auf dieses Ergebnis nehmen könnte, da diese Faktoren auch in der 493-6 Zelllinie Einfluß auf die Aktivität der CD73 nahmen.

7.4.2 Wechselbeziehungen der AdoR

Wie eingangs erwähnt findet man umfangreiche Modulationen der AdoR-Niveaus in den Patientenproben. Dennoch konnten komplexe Wechselbeziehungen der AdoR-Subtypen in diesen Proben erkannt werden, die in diesem Ausmaß nicht in den Kontrollproben zu erkennen waren und zum Teil auch entgegengesetzt gerichtet waren. Dies deutet darauf hin, daß die oben genannten Modulationen der Niveaus nicht unbedingt auf die genetische Instabilität des B-CLL-Genoms zurückzuführen, sondern Ergebnis eines Selektionsmechanismus sind. Eine mögliche Rolle der AdoR könnte darin liegen, daß erhöhte cAMP-Niveaus apoptotische Vorgänge in den B-CLL-Lymphozyten in Gang setzen können (Lerner *et al.* 2000).

Die cDNS-Niveaus des A1AdoR standen im positiven Bezug zu allen andern AdoR-Subtypen. Eine Erklärung wäre nun, daß der A1AdoR als der sensitivere der beiden inhibitorischen AdoR ein Art Gegengewicht zu erhöhten Niveaus excitatorischer Rezeptorsubtypen darstellt, um einer allzu drastischen Erhöhung des induzierten cAMP-Niveaus entgegenzuwirken. Zudem moduliert der A1AdoR den Ca^{2+} -Spiegel der Zellen, der in der CLL eine bedeutende Rolle z.B. bei der CD40- oder BCR-stimulierten Proliferation spielen (Meinhardt *et al.* 1999). Erwähnenswert ist hierbei auch, daß gerade der A1AdoR tendenziell vermehrt in der CD5^+ , CD19^+ -B-Zellpopulation exprimiert wurde (siehe 6.7.5; Tab. 18) und negativ mit Markern der T-Zellpopulation korrelierte. Auch in anderen Krebsarten, wie Dickdarmkrebs fand man erhöhte Niveaus des A1AdoR (Khoo *et al.* 1996), der damit durchaus eine Rolle bei der Tumorentwicklung spielen kann (Lelievre *et al.* 1998). Da NFκB eine bedeutende Rolle in der Expansion der B-CLL-Subpopulation spielt, kann die auch über A1AdoR-regulierte Aktivität von NFκB durchaus von Bedeutung sein (Li *et al.* 2000). Ähnliches dürfte auch für den A3AdoR gelten, der auch in diesem Zelltyp apoptotische Vorgänge in Gang setzen kann (Fishman *et al.* 2000); (Kohno *et al.* 1996). Dabei könnte der A1AdoR, ähnlich der Kooperation der beiden Subtypen bei der Antwort auf ischämische Vorgänge z.B. im Gehirn (von Lubitz 1999) der apoptotischen Induktion via dem A3AdoR entgegenwirken und somit einen Selektionsvorteil bieten.

Der A2aAdoR zeigte keine weiteren Beziehungen zu den anderen AdoR-Subtypen. Es konnten auch keine Korrelationen mit den A3AdoR-Subtyp gefunden werden, die man ansatzweise in der Kontrollgruppe erkennen konnte (Korr.-Koeffizient nach Pearson = -0,271). Dies würde sich mit den Ergebnissen der 493-6 Zelllinie decken, wo ebenfalls keine Wechselwirkungen zwischen den A2a- und A3AdoR bestanden. Jedoch steht dieses Resultat konträr zu den Beobachtungen der A2aAdoR-Transfektante in der HeLa-Zelllinie. Vermutlich sind Modifikationen der Wechselbeziehungen der AdoR untereinander sicherlich vom Zelltyp abhängig und können gerade in verschiedenen Carcinomen und Lymphomen unterschiedliche Modulationen erfahren. Auf jeden Fall spielt der A2aAdoR eine bedeutende Rolle bei der

Überlebensfähigkeit und Expansion der B-CLL-Lymphozyten. So wurde eindeutig ein Zusammenhang zwischen der Leukozytenanzahl und der A2aAdoR-Niveaus in dieser Studie gefunden (Pearson-Koeff.: -0,375). Viele der heute eingesetzten Medikamente modulieren das cAMP-Niveau der Zellen (Theophyllin) (Mentz *et al.* 1999) und induzieren darüber die Apoptosis, oder aber sind selektive A2aAdoR-Agonisten (2CA) (Barbieri *et al.* 1998), die ebenfalls über das cAMP-Niveau wirken können. Alternativ könnte auch Aktivierung diverser MAPK-Kaskaden (Sexl *et al.* 1997) und die damit einhergehende Regulation von Transkriptionsfaktoren, wie NF κ B (Zhao und Lee 1999); (Tuyt *et al.* 1999) oder Mitgliedern der AP-1-Familie (c-Jun/c-fos) (Whitmarsh und Davis 1996) eine Rolle spielen.

Ähnlich wie in der HeLa-Zelllinie zeigten die cDNS-Niveaus des A2bAdoR und des A3AdoR positive Korrelationen, was auf Interaktionen hindeutet. In dieser Situation könnte unter Umständen G $_q$ -abhängige Aktivierung der ERK-Kaskade antagonistisch zu A3AdoR-vermittelten apoptotischen Induktionssignalen wirken (Feoktistov *et al.* 1999).

A3AdoR zeigten neben einer Korrelation mit dem A1AdoR keine weiteren bedeutenden Beziehungen. Lediglich eine leichte, negative Korrelation mit der Leukozytenanzahl deutet darauf hin, daß dieser Rezeptor durchaus eine Rolle bei der Induktion apoptotischer Antworten oder der Regulation des Zellzyklus in der CLL spielt. Entgegen diesem Trend konnten starke Erhöhungen der Niveaus bei manchen Patienten gefunden werden (z.B. C38, C24, C18), die in Einzelfällen mit einer erhöhten Leukozytenanzahl (90000 Zellen/ μ l in Falle von C38) einher gingen. Diese Fälle zeigten aber alle starke Abweichungen von dem typischen Markerschema der CLL, insbesondere der CD5-, CD22- und CD23-Expression (siehe 9.2; Tab. 21), und stellen somit wahrscheinlich Mischformen dar. Interessanterweise fand man aber eine positive Assoziation der A3AdoR-Niveaus mit der CD22-Expression, einem B-CLL-untypischen Zelladhäsionsmolekül. Zu erwähnen ist auch noch eine Abnahme des A3AdoR-Niveaus mit zunehmenden Alter. Von anderen AdoR sind bereits altersbedingte Modulationen der Aktivität oder Expression z.B. im Gehirn (Lopes *et al.* 1999); (Economou *et al.* 2000) und Herzen (Romano und Dobson 1996) bekannt und somit könnte altersbedingte Abnahme des A3AdoR Teil eines natürlichen Alterungsprozesses sein.

7.4.3 ADA und c-myc

Die Untersuchung der Patientenproben zeigte deutliche Hinweise auf ein verändertes Expressionsschema der AdoR und Änderungen der CD73-Aktivität. Dies deckt sich mit den Ergebnissen bei Leukämien (Gutensohn und Thiel 1990). Demzufolge sollten Änderungen in der ADA-Aktivität ebenfalls zu dem veränderten „Signaling“ der AdoR beitragen. Leider konnten in Rahmen dieser Arbeit keine heterologen Standards mehr für die ADA etabliert werden. Jedoch konnten mit normalen PCR-Methoden diverse Änderungen in der Menge der ADA-cDNS innerhalb der Patientenproben beobachtet werden, die jedoch nicht eindeutig in einer Richtung ausfielen.

Vergleicht man die ADA-Niveaus mit den untersuchten Komponenten, so konnten diverse Korrelationen beobachtet werden.

ADA korrelierte positiv mit den A1AdoR-, den A2bAdoR-, wie auch mit den A3AdoR-Niveaus. Dies könnte auf eine immer noch recht stringente Kontrolle des AdoR-Signalweges in der CLL hindeuten. Zum einen dürfte somit eine zu starke Respons der excitatorischen AdoR und demzufolge ein ansteigendes cAMP-Niveau verhindert

werden. Hierbei sollte wohl erwähnt werden, daß man eine geringe -gerade nicht mehr signifikante- positive Korrelation der ADA zum A2aAdoR in dieser Patienten- gruppe beobachten konnte. Interessanterweise würde dies nicht dem aus der 493-6- Zelllinie gewonnenem Bild entsprechen, das ja eher eine Abnahme des ADA- Niveaus mit Zunahme des A2aAdoR-Niveaus favorisieren würde. Dies könnte jedoch auch an der gänzlich anderen Morphologie der CLL-Lymphozyten liegen. Wie bereits erwähnt verharren diese eher in einem quieszenten Zustand mit geringen Proliferati- onsraten und wären somit nicht so sehr von mitogenen Signalen, wie bei dem 493-6- Modell vorgeschlagen, abhängig. Vielmehr dürften eher Schutzmechanismen vor Apoptose in dieser Zelllinie, wie BCL2-Überexpression (Keating 1999) und antiinflammatorisches NF κ B-Signaling (Schuh *et al.* 1996) eine Rolle spielen. Zudem konnte man in der Kontrollgruppe eine positive Korrelation zum A2aAdoR finden, in der ebenfalls eine nicht allzu große Abhängigkeit von AdoR-vermittelten mitogenen Signalen vorherrschen sollte. Aufgrund der oben genannten Gründe könnte es somit sein, daß, trotz generell relativ hoher c-myc-Präsenz in der CLL (Fellbaum *et al.* 1992); (Bentz *et al.* 1995), der A2aAdoR in den Patientenproben dennoch öfters hochreguliert gefunden wurde.

Im Falle der inhibitorischen AdoR könnte die positive Korrelation mit der ADA mit den aktivitätsregulierenden Eigenschaften der ADA bezüglich dieser Rezeptoren zusammenhängen. Zwar konnte bis dato nur für den A1AdoR eine wichtige Rolle der ADA bei der Desensibilisierung und Internalisierung nachgewiesen werden (Saura *et al.* 1998), aber auch der A3AdoR kann über ähnliche Internalisierungsmechanismen in seiner Aktivität reguliert werden, wobei bei diesem Subtyp eher die GRK-vermit- telte Desensibilisierung eine Rolle spielt (Ferguson *et al.* 2000).

Generell fanden sich keine signifikante Beziehungen der ADA zur Leukozytenanzahl, deren Verdoppelungsrate einen prognostischen Faktor in der CLL darstellt, was auch auf einen etwas differenzierten Effekt der ADA-Aktivität auf die verschiedenen Subty- pen hindeutet und zudem einen intakten Apparat zur Regulation der verschiedenen AdoR-Respons voraussetzt. Man fand eine sehr deutliche Abnahme der ADA- Niveaus mit dem Alter, die man so nicht in der Kontrollgruppe fand (Pearson-Korr: 0,484 in der Kontrolle; -0,425 in der Patientengruppe). Jedoch sollte man das deutliche jüngere Durchschnittsalter der Kontrollgruppe bei dieser Betrachtung nicht außer Acht lassen. Da diese chronische Krankheit durch eine allmähliche Expansion der Tumorzellen im Blutbild gekennzeichnet ist, könnte diese Abnahme der ADA- Niveaus durchaus eine tumorfördernde Wirkung über Inhibition der Immunantwort (Sitkovsky 1998) und verstärkte antiapoptotische Wirkung von Adenosin über inhibitorische AdoR durch Regulation des Ca²⁺-Niveaus haben (Meinhardt *et al.* 1999), zudem altersbedingte Modifikationen des G_s/G_i-Gehalts in diversen Zelltypen bekannt sind (Fraeyman *et al.* 2000).

Auch die c-myc-Niveaus zeigten deutliche Abweichungen zu den Werten der Kontrollgruppe (siehe 6.7.2 Tab. 14). In den meisten Fällen war erwartungsgemäß eine Amplifikation der cDNS-Niveaus in den Patientenproben zu finden. Jedoch fand sich nur eine geringe, nicht signifikante negative Korrelation mit der Leukozy- tenanzahl, was insofern etwas überraschend ist, da auf eine deutliche Rolle der c- myc in der Überlebensfähigkeit der CLL-Lymphozyten hingewiesen wurde (Caligaris- Cappio *et al.* 1993) und ebenfalls genetische Aberrationen des c-myc-Genlocus in der Literatur beschrieben wurden (Bentz *et al.* 1995). Eine genauere Untersuchung mit einer größeren Patientenanzahl sollte deshalb in Zukunft angestrebt werden. Erwähnenswert ist noch eine nicht ganz signifikante negative Korrelation der c-myc- Niveaus mit dem Alter, was auch auf eine Rolle des c-myc in der Induktion der

Apoptose in der CLL deuten könnte. c-myc ist generell als Transkriptionsfaktor an der Regulation des Zellzyklus beteiligt (Amati *et al.* 1998) und ist unter anderem auch über p53 und Bax mit der apoptotischen Signalkaskade verschaltet (Mitchell *et al.* 2000); (Roy *et al.* 1994), womit c-myc eine ambivalente Natur auf das Überleben der Zellen haben kann.

Die c-myc-Niveaus korrelierten ebenso mit denen der A1AdoR, der A3AdoR und ebenfalls der ADA. Dieser Befund deutet darauf hin, daß c-myc auch bei der transkriptionellen Regulation dieser Komponenten des AdoR-Signalweges beteiligt sein könnte. Auf jeden Fall kann c-myc durch EBNA2 (Kaiser *et al.* 1999) oder NF κ B (Arsura *et al.* 1996) reguliert werden und ist somit ähnlichen Regulationsmechanismen, wie die AdoR unterworfen. Insofern könnte c-myc durchaus auch modulierend auf den AdoR-Signalweg wirken. Vor allem aber fiel eine enge Kopplung der c-myc mit den ADA-Niveaus auf. Es besteht die Möglichkeit, daß c-myc die ADA-Transkription regulieren kann, wie man bereits in dem 493-6-Modellsystem ansatzweise erkennen konnte, zumal man auch die gleiche Korrelation in der Kontrollgruppe fand.

7.5 Prognostische Implikationen des AdoR-Signalweges

Viele Modifikationen der Expressionsschemata der untersuchten Komponenten des AdoR-Signalweges konnten in dieser Studie aufgezeigt werden. Bezüglich der Leukozytenzahl, deren Verdoppelungsrate wichtige prognostische Aussagen in der CLL liefert, sind wohl Korrelationen mit der CD73-Aktivität, die einen Differenzierungsmarker der B-Lymphozyten darstellt, wie auch der cDNS-Gehalt an A2aAdoR wie auch A3AdoR zu nennen. Die letztgenannten beiden sind hauptsächlich durch ihre apoptotische Wirkung in Form von Ado-Analoga wichtige Mittel bei der Behandlung dieser Krankheit des Blutbildes (Barbieri *et al.* 1998). Gerade der A2aAdoR erwies sich in dieser Hinsicht als interessanter Faktor im Verlauf der Krankheit, der sich überwiegend in erhöhten Leukozytenwerten widerspiegelt. Daß es einen ursächlichen Zusammenhang zwischen A2aAdoR-„Downregulation“ und Zunahme der Leukozytenanzahl gibt, konnte auch bei 4 Patientinnen in nachfolgenden Untersuchungen bestätigt werden. Im Fall der Zunahme der Leukozytenanzahl konnte eine deutliche Abnahme der A2aAdoR-Niveaus gefunden werden, wogegen steigende bzw. gleichbleibende Niveaus zu keiner bzw. nur geringen Zunahme der Leukozytenzahl führte.

Betrachtet man die Patientengruppe nach ihrer klinischen Einteilung nach Binet (Zwiebel und Cheson 1998), konnte man leider im allgemeinen keine Korrelation mit den untersuchten Komponenten feststellen.

Ebenfalls scheint die ADA-Aktivität eine große Rolle bei der Expansion der malignen Lymphozytenpopulation zu spielen und unter anderem auch modulierend auf die Signalfortleitung der AdoR zu wirken. Die in der Patientengruppe beobachtete Abnahme mit fortschreitendem Alter und damit einhergehender Expansion der CLL, könnte ebenfalls von klinischer Relevanz sein. Inwiefern die c-myc-Expression in die Modulation der AdoR-Signalwege Einfluß nehmen kann, sollte weiter untersucht werden. Erste Hinweise deuten auf jeden Fall auf eine Regulation der ADA-Transkription und evtl. diverser AdoR-Subtypen durch c-myc hin.

8 Literaturverzeichnis

Abbracchio, M. P., R. Brambilla, S. Ceruti, H. O. Kim, D. K. von Lubitz, K. A. Jacobson und F. Cattabeni (1995). "G protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A3 receptors in rat brain." Mol Pharmacol: 1038-45.

Abbracchio, M. P., G. Rainaldi, A. M. Giammarioli, S. Ceruti, R. Brambilla, F. Cattabeni, D. Barbieri, C. Franceschi, K. A. Jacobson und W. Malorni (1997). "The A3 adenosine receptor mediates cell spreading, reorganization of actin cytoskeleton, and distribution of Bcl-XL: studies in human astrogloma cells." Biochem Biophys Res Commun: 297-304.

Abbracchio, M. P. und F. Cattabeni (1999). "Brain adenosine receptors as targets for therapeutic intervention in neurodegenerative diseases." Ann N Y Acad Sci: 79-92.

Adachi, M., A. Tefferi, P. R. Greipp, T. J. Kipps und Y. Tsujimoto (1990). "Preferential linkage of bcl-2 to immunoglobulin light chain gene in chronic lymphocytic leukemia." J Exp Med: 559-64.

Ahmed, A. H. und L. A. Heppel (1997). "Evidence for a role of G protein beta gamma subunits in the enhancement of cAMP accumulation and DNA synthesis by adenosine in human cells." J Cell Physiol: 263-71.

Airas, L., J. Hellman, M. Salmi, P. Bono, T. Puurunen, D. J. Smith und S. Jalkanen (1995). "CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73." J Exp Med: 1603-8.

Amati, B., K. Alevizopoulos und J. Vlach (1998). "Myc and the cell cycle." Front Biosci: 250-68.

Ambrosio, A. F., J. O. Malva, A. P. Carvalho und C. M. Carvalho (1997). "Inhibition of N-,P/Q- and other types of Ca²⁺ channels in rat hippocampal nerve terminals by the adenosine A1 receptor." Eur J Pharmacol: 301-10.

Andrisani, O. M. (1999). "CREB-mediated transcriptional control." Crit Rev Eukaryot Gene Expr: 19-32.

Apasov, S., M. Koshiba, F. Redegeld und M. V. Sitkovsky (1995). "Role of extracellular ATP and P1 and P2 classes of purinergic receptors in T-cell development and cytotoxic T lymphocyte effector functions." Immunol Rev: 5-19.

Apasov, S., J. F. Chen, P. Smith und M. Sitkovsky (2000). "A(2A) receptor dependent and A(2A) receptor independent effects of extracellular adenosine on murine thymocytes in conditions of adenosine deaminase deficiency." Blood: 3859-67.

Armstead, W. M. (1997). "Role of nitric oxide, cyclic nucleotides, and the activation of ATP- sensitive K⁺ channels in the contribution of adenosine to hypoxia- induced pial artery dilation." J Cereb Blood Flow Metab: 100-8.

Arsura, M., M. Wu und G. E. Sonenshein (1996). "TGF beta 1 inhibits NF-kappa B/Rel activity inducing apoptosis of B cells: transcriptional activation of I kappa B alpha." Immunity: 31-40.

Atkinson, M. R., A. Townsend-Nicholson, J. K. Nicholl, G. R. Sutherland und P. R. Schofield (1997). "Cloning, characterisation and chromosomal assignment of the human adenosine A3 receptor (ADORA3) gene." Neurosci Res: 73-9.

Auchampach, J. A., X. Jin, T. C. Wan, G. H. Caughey und J. Linden (1997). "Canine mast cell adenosine receptors: cloning and expression of the A3 receptor and evidence that degranulation is mediated by the A2B receptor." Mol Pharmacol: 846-60.

Baines, C. P., M. V. Cohen und J. M. Downey (1999). "Signal transduction in ischemic preconditioning: the role of kinases and mitochondrial K(ATP) channels." J Cardiovasc Electrophysiol: 741-54.

Barbieri, D., M. P. Abbracchio, S. Salvioli, D. Monti, A. Cossarizza, S. Ceruti, R. Brambilla, F. Cattabeni, K. A. Jacobson und C. Franceschi (1998). "Apoptosis by 2-chloro-2'-deoxy-adenosine and 2-chloro-adenosine in human peripheral blood mononuclear cells." Neurochem Int: 493-504.

Beatus, P. und U. Lendahl (1998). "Notch and neurogenesis." J Neurosci Res: 125-36.

Beck, F. W., J. Kaplan, N. Fine, W. Handschu und A. S. Prasad (1997). "Decreased expression of CD73 (ecto-5'-nucleotidase) in the CD8+ subset is associated with zinc deficiency in human patients." J Lab Clin Med: 147-56.

Begleiter, A., M. Mowat, L. G. Israels und J. B. Johnston (1996). "Chlorambucil in chronic lymphocytic leukemia: mechanism of action." Leuk Lymphoma: 187-201.

Bell, R. M., Y. A. Hannun und C. R. Loomis (1986). "Mechanism of regulation of protein kinase C by lipid second messengers." Symp Fundam Cancer Res: 145-56.

Bellosillo, B., M. Dalmau, D. Colomer und J. Gil (1997). "Involvement of CED-3/ICE proteases in the apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells." Blood: 3378-84.

Bentz, M., K. Huck, S. du Manoir, S. Joos, C. A. Werner, K. Fischer, H. Dohner und P. Lichter (1995). "Comparative genomic hybridization in chronic B-cell leukemias shows a high incidence of chromosomal gains and losses." Blood: 3610-8.

Blom, W. M., H. J. de Bont, I. Meijerman, G. J. Mulder und J. F. Nagelkerke (1999). "Prevention of cycloheximide-induced apoptosis in hepatocytes by adenosine and by caspase inhibitors." Biochem Pharmacol: 1891-8.

Bornfeldt, K. E. und E. G. Krebs (1999). "Crosstalk between protein kinase A and growth factor receptor signaling pathways in arterial smooth muscle." Cell Signal: 465-77.

- Bouma, M. G., T. M. Jeunhomme, D. L. Boyle, M. A. Dentener, N. N. Voitenok, F. A. van den Wildenberg und W. A. Buurman (1997). "Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood: involvement of adenosine A2 and A3 receptors." J Immunol: 5400-8.
- Brambilla, R., F. Cattabeni, S. Ceruti, D. Barbieri, C. Franceschi, Y. C. Kim, K. A. Jacobson, K. N. Klotz, M. J. Lohse und M. P. Abbracchio (2000). "Activation of the A3 adenosine receptor affects cell cycle progression and cell growth." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol: 225-34.
- Brown, A. G., F. M. Ross, E. M. Dunne, C. M. Steel und E. M. Weir-Thompson (1993). "Evidence for a new tumour suppressor locus (DBM) in human B-cell neoplasia telomeric to the retinoblastoma gene." Nat Genet: 67-72.
- Caligaris-Cappio, F., D. Gottardi, A. Alfarano, A. Stacchini, M. G. Gregoret, P. Ghia, M. T. Bertero, A. Novarino und L. Bergui (1993). "The nature of the B lymphocyte in B-chronic lymphocytic leukemia." Blood Cells: 601-13.
- Carr, C. S., R. J. Hill, H. Masamune, S. P. Kennedy, D. R. Knight, W. R. Tracey und D. M. Yellon (1997). "Evidence for a role for both the adenosine A1 and A3 receptors in protection of isolated human atrial muscle against simulated ischaemia." Cardiovasc Res: 52-9.
- Chapal, J., M. M. Loubatieres-Mariani, P. Petit und M. Roye (1985). "Evidence for an A2-subtype adenosine receptor on pancreatic glucagon secreting cells." Br J Pharmacol: 565-9.
- Chen, T. C., D. R. Hinton, R. Zidovetzki und F. M. Hofman (1998). "Up-regulation of the cAMP/PKA pathway inhibits proliferation, induces differentiation, and leads to apoptosis in malignant gliomas." Lab Invest: 165-74.
- Chern, Y., J. Y. Chiou, H. L. Lai und M. H. Tsai (1995). "Regulation of adenylyl cyclase type VI activity during desensitization of the A2a adenosine receptor-mediated cyclic AMP response: role for protein phosphatase 2A." Mol Pharmacol: 1-8.
- Chiarugi, V. und M. Ruggiero (1996). "Role of three cancer "master genes" p53, bcl2 and c-myc on the apoptotic process." Tumori: 205-9.
- Chow, S. C., G. E. Kass und S. Orrenius (1997). "Purines and their roles in apoptosis." Neuropharmacology: 1149-56.
- Clancy, J. P., F. E. Ruiz und E. J. Sorscher (1999). "Adenosine and its nucleotides activate wild-type and R117H CFTR through an A2B receptor-coupled pathway." Am J Physiol: 361-9.
- Coskey, L. A., J. Bitting und M. D. Roth (1993). "Inhibition of natural killer cell activity by therapeutic levels of theophylline." Am J Respir Cell Mol Biol: 659-65.

- Costenla, A. R., L. V. Lopes, A. de Mendonca und J. A. Ribeiro (2001). "A functional role for adenosine A3 receptors: modulation of synaptic plasticity in the rat hippocampus." Neurosci Lett: 53-7.
- Cronstein, B. N. (1994). "Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent." J Appl Physiol: 5-13.
- Cunha, R. A., E. Milusheva, E. S. Vizi, J. A. Ribeiro und A. M. Sebastiao (1994). "Excitatory and inhibitory effects of A1 and A2A adenosine receptor activation on the electrically evoked [3H]acetylcholine release from different areas of the rat hippocampus." J Neurochem: 207-14.
- Cunha, R. A., B. Johansson, B. B. Fredholm, J. A. Ribeiro und A. M. Sebastiao (1995). "Adenosine A2A receptors stimulate acetylcholine release from nerve terminals of the rat hippocampus." Neurosci Lett: 41-4.
- Cunha, R. A. und J. A. Ribeiro (2000). "Purinergic modulation of [(3)H]GABA release from rat hippocampal nerve terminals." Neuropharmacology: 1156-67.
- de Jong, J. W., R. de Jonge, E. Keijzer und S. Bradamante (2000). "The role of adenosine in preconditioning." Pharmacol Ther: 141-9.
- Deckert, J., M. M. Nothen, S. P. Bryant, H. Ren, H. K. Wolf, G. L. Stiles, N. K. Spurr und P. Propping (1995). "Human adenosine A1 receptor gene: systematic screening for DNA sequence variation and linkage mapping on chromosome 1q31-32.1 using a silent polymorphism in the coding region." Biochem Biophys Res Commun: 614-21.
- Deckert, J., M. M. Nothen, S. P. Bryant, S. Schuffenhauer, P. R. Schofield, N. K. Spurr und P. Propping (1997). "Mapping of the human adenosine A2a receptor gene: relationship to potential schizophrenia loci on chromosome 22q and exclusion from the CATCH 22 region." Hum Genet: 326-8.
- Delmer, A., F. Ajchenbaum-Cymbalista, R. Tang, S. Ramond, A. M. Faussat, J. P. Marie und R. Zittoun (1995). "Overexpression of cyclin D2 in chronic B-cell malignancies." Blood: 2870-6.
- Di Virgilio, F., C. Mutini, P. Chiozzi, S. Falzoni, M. Di Susino, J. M. Sanz und D. Ferrari (1996). "A purinergic hypothesis for immunomodulation." Ital J Biochem: 195-203.
- Digel, W., M. Stefanic, W. Schoniger, C. Buck, A. Raghavachar, N. Frickhofen, H. Heimpel und F. Porzolt (1989). "Tumor necrosis factor induces proliferation of neoplastic B cells from chronic lymphocytic leukemia." Blood: 1242-6.
- Dixon, A. K., L. Widdowson und P. J. Richardson (1997). "Desensitisation of the adenosine A1 receptor by the A2A receptor in the rat striatum." J Neurochem: 315-21.

Dohner, H., S. Pohl, M. Bulgay-Morschel, S. Stilgenbauer, M. Bentz und P. Lichter (1993). "Trisomy 12 in chronic lymphoid leukemias--a metaphase and interphase cytogenetic analysis." Leukemia: 516-20.

Dohner, H., K. Fischer, M. Bentz, K. Hansen, A. Benner, G. Cabot, D. Diehl, R. Schlenk, J. Coy, S. Stilgenbauer und et al. (1995). "p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias." Blood: 1580-9.

Dohner, H., S. Stilgenbauer, K. Dohner, M. Bentz und P. Lichter (1999). "Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis." J Mol Med: 266-81.

Dubey, R. K., D. G. Gillespie und E. K. Jackson (1998). "Adenosine inhibits collagen and protein synthesis in cardiac fibroblasts: role of A2B receptors." Hypertension: 943-8.

Dunwiddie, T. V., L. Diao, H. O. Kim, J. L. Jiang und K. A. Jacobson (1997). "Activation of hippocampal adenosine A3 receptors produces a desensitization of A1 receptor-mediated responses in rat hippocampus." J Neurosci: 607-14.

Ekonomou, A., O. Pagonopoulou und F. Angelatou (2000). "Age-dependent changes in adenosine A1 receptor and uptake site binding in the mouse brain: an autoradiographic study." J Neurosci Res: 257-65.

Evan, G. und T. Littlewood (1998). "A matter of life and cell death." Science: 1317-22.

Fellbaum, C., T. Radaszkiewicz, C. Ruhri, B. Putz, W. Lehmacher und H. Hofler (1992). "c-myc mRNA expression in non-Hodgkin's lymphomas." Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol: 61-8.

Fenster, M. S., R. K. Shepherd, J. Linden und B. R. Duling (2000). "Activation of adenosine A2 alpha receptors inhibits mast cell degranulation and mast cell-dependent vasoconstriction." Microcirculation: 129-35.

Feoktistov, I. und I. Biaggioni (1995). "Adenosine A2b receptors evoke interleukin-8 secretion in human mast cells. An enprofylline-sensitive mechanism with implications for asthma." J Clin Invest: 1979-86.

Feoktistov, I., A. E. Goldstein und I. Biaggioni (1999). "Role of p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated protein kinase kinase in adenosine A2B receptor-mediated interleukin-8 production in human mast cells." Mol Pharmacol: 726-34.

Ferguson, G., K. R. Watterson und T. M. Palmer (2000). "Subtype-specific kinetics of inhibitory adenosine receptor internalization are determined by sensitivity to phosphorylation by G protein-coupled receptor kinases." Mol Pharmacol: 546-52.

- Fishman, P., S. Bar-Yehuda, G. Ohana, S. Pathak, L. Wasserman, F. Barer und A. S. Multani (2000). "Adenosine acts as an inhibitor of lymphoma cell growth: a major role for the A3 adenosine receptor." Eur J Cancer: 1452-8.
- Forsythe, P. und M. Ennis (1999). "Adenosine, mast cells and asthma." Inflamm Res: 301-7.
- Fraeyman, N., E. Van de Velde, A. Van Ermen, A. Bazan, P. Vanderheyden, J. Van Emmelo und J. Vandekerckhove (2000). "Effect of maturation and aging on beta-adrenergic signal transduction in rat kidney and liver." Biochem Pharmacol: 1787-95.
- Frank, D. A., S. Mahajan und J. Ritz (1997). "B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia contain signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and STAT3 constitutively phosphorylated on serine residues." J Clin Invest: 3140-8.
- Fredholm, B. B., M. P. Abbracchio, G. Burnstock, J. W. Daly, T. K. Harden, K. A. Jacobson, P. Leff und M. Williams (1994). "Nomenclature and classification of purinoceptors." Pharmacol Rev: 143-56.
- Fredholm, B. B. (1995). "Astra Award Lecture. Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine." Pharmacol Toxicol: 93-101.
- Fredholm, B. B. und A. Wallman-Johansson (1996). "Effects of ethanol and acetate on adenosine production in rat hippocampal slices." Pharmacol Toxicol: 120-3.
- Fredholm, B. B. (1997). "Purines and neutrophil leukocytes." Gen Pharmacol: 345-50.
- Galea, E. und D. L. Feinstein (1999). "Regulation of the expression of the inflammatory nitric oxide synthase (NOS2) by cyclic AMP." Faseb J: 2125-37.
- Gao, Z., Y. Ni, G. Szabo und J. Linden (1999). "Palmitoylation of the recombinant human A1 adenosine receptor: enhanced proteolysis of palmitoylation-deficient mutant receptors." Biochem J: 387-95.
- Gao, Z., B. S. Li, Y. J. Day und J. Linden (2001). "A3 adenosine receptor activation triggers phosphorylation of protein kinase B and protects rat basophilic leukemia 2H3 mast cells from apoptosis." Mol Pharmacol: 76-82.
- Garte, S. J. (1993). "The c-myc oncogene in tumor progression." Crit Rev Oncog: 435-49.
- Germack, R. und J. M. Dickenson (2000). "Activation of protein kinase B by the A(1)-adenosine receptor in DDT(1)MF-2 cells." Br J Pharmacol: 867-74.
- Gines, S., J. Hillion, M. Torvinen, S. Le Crom, V. Casado, E. I. Canela, S. Rondin, J. Y. Lew, S. Watson, M. Zoli, L. F. Agnati, P. Verniera, C. Lluís, S. Ferre, K. Fuxe und R. Franco (2000). "Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes." Proc Natl Acad Sci U S A: 8606-11.

Grady, E. F., S. K. Bohm und N. W. Bunnett (1997). "Turning off the signal: mechanisms that attenuate signaling by G protein-coupled receptors." Am J Physiol: G586-601.

Gubitz, A. K., L. Widdowson, M. Kurokawa, K. A. Kirkpatrick und P. J. Richardson (1996). "Dual signalling by the adenosine A2a receptor involves activation of both N- and P-type calcium channels by different G proteins and protein kinases in the same striatal nerve terminals." J Neurochem: 374-81.

Gutensohn, W. und E. Thiel (1990). "Prognostic implication of ecto-5'-nucleotidase activity in acute lymphoblastic leukemia." Cancer: 1755-8.

Gutensohn, W., R. Resta, Y. Misumi, Y. Ikehara und L. F. Thompson (1995). "Ecto-5'-nucleotidase activity is not required for T cell activation through CD73." Cell Immunol: 213-7.

Hakonarson, H. und M. M. Grunstein (1998). "Regulation of second messengers associated with airway smooth muscle contraction and relaxation." Am J Respir Crit Care Med: S115-22.

Hanada, M., D. Delia, A. Aiello, E. Stadtmauer und J. C. Reed (1993). "bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia." Blood: 1820-8.

Hannon, J. P., H. J. Pfannkuche und J. R. Fozard (1995). "A role for mast cells in adenosine A3 receptor-mediated hypotension in the rat." Br J Pharmacol: 945-52.

Hansen, K. R., R. Resta, C. F. Webb und L. F. Thompson (1995). "Isolation and characterization of the promoter of the human 5'- nucleotidase (CD73)-encoding gene." Gene: 307-12.

Hasko, G., D. G. Kuhel, J. F. Chen, M. A. Schwarzschild, E. A. Deitch, J. G. Mabley, A. Marton und C. Szabo (2000). "Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms." Faseb J: 2065-74.

Heilbronn, A., V. Maienschein, K. Carstensen, W. Gann und H. Zimmermann (1995). "Crucial role of ecto-5'-nucleotidase in differentiation and survival of developing neural cells." Neuroreport: 257-61.

Hemenway, C. S. und J. Heitman (1999). "Calcineurin. Structure, function, and inhibition." Cell Biochem Biophys: 115-51.

Hershfield, M. S. (1998). "Adenosine deaminase deficiency: clinical expression, molecular basis, and therapy." Semin Hematol: 291-8.

Higuchi, R., B. Krummel und R. K. Saiki (1988). "A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions." Nucleic Acids Res: 7351-67.

- Hillaire-Buys, D., J. Chapal, G. Bertrand, P. Petit und M. M. Loubatieres-Mariani (1994). "Purinergic receptors on insulin-secreting cells." Fundam Clin Pharmacol: 117-27.
- Hivroz, C., B. Geny, J. C. Brouet und C. Grillot-Courvalin (1990). "Altered signal transduction secondary to surface IgM cross-linking on B- chronic lymphocytic leukemia cells. Differential activation of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C." J Immunol: 2351-8.
- Hoque, N., M. A. Cook und M. Karmazyn (2000). "Inhibition of alpha(1)-adrenergic-mediated responses in rat ventricular myocytes by adenosine A(1) receptor activation: role of the K(ATP) channel." J Pharmacol Exp Ther: 770-7.
- Huang, S., S. Apasov, M. Koshiba und M. Sitkovsky (1997). "Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion." Blood: 1600-10.
- Hughes, A. R. und J. W. Putney, Jr. (1990). "Inositol phosphate formation and its relationship to calcium signaling." Environ Health Perspect: 141-7.
- Imura, T. und S. Shimohama (2000). "Opposing effects of adenosine on the survival of glial cells exposed to chemical ischemia." J Neurosci Res: 539-46.
- Jabbar, S. A., A. V. Hoffbrand und R. G. Wickremasinghe (1995). "Defects in signal transduction pathways in chronic B lymphocytic leukemia cells." Leuk Lymphoma: 163-70.
- Johnston, J. B., P. Daeninck, L. Verburg, K. Lee, G. Williams, L. G. Israels, M. R. Mowat und A. Begleiter (1997). "P53, MDM-2, BAX and BCL-2 and drug resistance in chronic lymphocytic leukemia." Leuk Lymphoma: 435-49.
- Justement, L. B., K. S. Campbell, N. C. Chien und J. C. Cambier (1991). "Regulation of B cell antigen receptor signal transduction and phosphorylation by CD45." Science: 1839-42.
- Kaiser, C., G. Laux, D. Eick, N. Jochner, G. W. Bornkamm und B. Kempkes (1999). "The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2." J Virol: 4481-4.
- Keating, M. J. (1999). "Chronic lymphocytic leukemia." Semin Oncol: 107-14.
- Khisti, R. T., C. T. Chopde und E. Abraham (2000). "GABAergic involvement in motor effects of an adenosine A(2A) receptor agonist in mice." Neuropharmacology: 1004-15.
- Khoo, H. E., C. L. Ho, V. J. Chhatwal, S. T. Chan, S. S. Ngoi und S. M. Moolchala (1996). "Differential expression of adenosine A1 receptors in colorectal cancer and related mucosa." Cancer Lett: 17-21.

- Kleppisch, T. und M. T. Nelson (1995). "Adenosine activates ATP-sensitive potassium channels in arterial myocytes via A2 receptors and cAMP-dependent protein kinase." Proc Natl Acad Sci U S A: 12441-5.
- Klotz, K. N., J. Hessling, J. Hegler, C. Owman, B. Kull, B. B. Fredholm und M. J. Lohse (1998). "Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes - characterization of stably transfected receptors in CHO cells." Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol: 1-9.
- Kohno, Y., Y. Sei, M. Koshiba, H. O. Kim und K. A. Jacobson (1996). "Induction of apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by adenosine A(3) receptor agonists." Biochem Biophys Res Commun: 904-10.
- Kretzler, M., B. Schroppel, M. Merkle, S. Huber, P. Mundel, M. Horster und D. Schlondorff (1998). "Detection of multiple vascular endothelial growth factor splice isoforms in single glomerular podocytes." Kidney Int Suppl: S159-61.
- Kruger, K. H., L. F. Thompson, M. Kaufmann und P. Moller (1991). "Expression of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in normal mammary gland and in breast carcinoma." Br J Cancer: 114-8.
- Kull, B., S. Ferre, G. Arslan, P. Svenningsson, K. Fuxe, C. Owman und B. B. Fredholm (1999). "Reciprocal interactions between adenosine A2A and dopamine D2 receptors in Chinese hamster ovary cells co-transfected with the two receptors." Biochem Pharmacol: 1035-45.
- Lagneaux, L., A. Delforge, D. Bron, M. Massy, M. Bernier und P. Stryckmans (1997). "Heterogenous response of B lymphocytes to transforming growth factor- beta in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: correlation with the expression of TGF-beta receptors." Br J Haematol: 612-20.
- Lelievre, V., J. M. Muller und J. Falcon (1998). "Adenosine modulates cell proliferation in human colonic carcinoma. II. Differential behavior of HT29, DLD-1, Caco-2 and SW403 cell lines." Eur J Pharmacol: 299-308.
- Lerner, A., D. H. Kim und R. Lee (2000). "The cAMP signaling pathway as a therapeutic target in lymphoid malignancies." Leuk Lymphoma: 39-51.
- LeVine, H., 3rd (1999). "Structural features of heterotrimeric G-protein-coupled receptors and their modulatory proteins." Mol Neurobiol: 111-49.
- Li, C., T. Ha, L. Liu, W. Browder und R. L. Kao (2000). "Adenosine prevents activation of transcription factor NF-kappa B and enhances activator protein-1 binding activity in ischemic rat heart." Surgery: 161-9.
- Li, B., C. Yang, D. M. Rosenbaum und S. Roth (2000). "Signal transduction mechanisms involved in ischemic preconditioning in the rat retina in vivo." Exp Eye Res: 755-65.

- Linden, J. (1994). "Cloned adenosine A3 receptors: pharmacological properties, species differences and receptor functions." Trends Pharmacol Sci: 298-306.
- Linden, J. (2001). "Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection." Annu Rev Pharmacol Toxicol: 775-87.
- Lopes, L. V., R. A. Cunha und J. A. Ribeiro (1999). "Increase in the number, G protein coupling, and efficiency of facilitatory adenosine A2A receptors in the limbic cortex, but not striatum, of aged rats." J Neurochem: 1733-8.
- Marshall, J. M. (2000). "Adenosine and muscle vasodilatation in acute systemic hypoxia." Acta Physiol Scand: 561-73.
- Meinhardt, G., C. M. Wendtner und M. Hallek (1999). "Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: factors and signaling pathways regulating cell growth and survival." J Mol Med: 282-93.
- Mentz, F., H. Merle-Beral und A. H. Dalloul (1999). "Theophylline-induced B-CLL apoptosis is partly dependent on cyclic AMP production but independent of CD38 expression and endogenous IL-10 production." Leukemia: 78-84.
- Miller, K. J. und B. J. Hoffman (1994). "Adenosine A3 receptors regulate serotonin transport via nitric oxide and cGMP." J Biol Chem: 27351-6.
- Mitchell, K. O., M. S. Ricci, T. Miyashita, D. T. Dicker, Z. Jin, J. C. Reed und W. S. El-Deiry (2000). "Bax is a transcriptional target and mediator of c-myc-induced apoptosis." Cancer Res: 6318-25.
- Mundell, S. J. und E. Kelly (1998). "Evidence for co-expression and desensitization of A2a and A2b adenosine receptors in NG108-15 cells." Biochem Pharmacol: 595-603.
- Munshi, R., I. H. Pang, P. C. Sternweis und J. Linden (1991). "A1 adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins Gi1, Gi2, and Go." J Biol Chem: 22285-9.
- Mutafova-Yambolieva, V. N. und K. D. Keef (1997). "Adenosine-induced hyperpolarization in guinea pig coronary artery involves A2b receptors and KATP channels." Am J Physiol: H2687-95.
- Narravula, S., P. F. Lennon, B. U. Mueller und S. P. Colgan (2000). "Regulation of endothelial CD73 by adenosine: paracrine pathway for enhanced endothelial barrier function." J Immunol: 5262-8.
- Nasi, S., R. Ciarapica, R. Jucker, J. Rosati und L. Soucek (2001). "Making decisions through Myc." FEBS Lett: 153-62.

- Navarro, J. M., N. Olmo, J. Turnay, M. T. Lopez-Conejo und M. A. Lizarbe (1998). "Ecto-5'-nucleotidase from a human colon adenocarcinoma cell line. Correlation between enzyme activity and levels in intact cells." Mol Cell Biochem: 121-31.
- Newton, C. R., Graham, A. (1994). "PCR" Oxford. Bios Scientific Publishers Ltd.
- Nie, Z., Y. Mei und V. Ramkumar (1997). "Short term desensitization of the A1 adenosine receptors in DDT1MF-2 cells." Mol Pharmacol: 456-64.
- Nie, Z., Y. Mei, M. Ford, L. Rybak, A. Marcuzzi, H. Ren, G. L. Stiles und V. Ramkumar (1998). "Oxidative stress increases A1 adenosine receptor expression by activating nuclear factor kappa B." Mol Pharmacol: 663-9.
- O'Brien, S., H. Kantarjian und M. J. Keating (1996). "Purine analogs in chronic lymphocytic leukemia and Waldenstrom's macroglobulinemia." Ann Oncol: S27-33.
- Offit, K., N. Z. Parsa, G. Gaidano, D. A. Filippa, D. Louie, D. Pan, S. C. Jhanwar, R. Dalla-Favera und R. S. Chaganti (1993). "6q deletions define distinct clinico-pathologic subsets of non- Hodgkin's lymphoma." Blood: 2157-62.
- Olah, M. E., H. Ren und G. L. Stiles (1995). "Adenosine receptors: protein and gene structure." Arch Int Pharmacodyn Ther: 135-50.
- Olah, M. E. und G. L. Stiles (1997). "Site-directed mutagenesis and chimeric receptors in the study of receptor-ligand binding." Methods Mol Biol: 25-43.
- Olah, M. E. und G. L. Stiles (2000). "The role of receptor structure in determining adenosine receptor activity." Pharmacol Ther: 55-75.
- Pajic, A., D. Spitkovsky, B. Christoph, B. Kempkes, M. Schuhmacher, M. S. Staeger, M. Briemeier, J. Ellwart, F. Kohlhuber, G. W. Bornkamm, A. Polack und D. Eick (2000). "Cell cycle activation by c-myc in a Burkitt lymphoma model cell line." Int J Cancer: 787-93.
- Palmer, T. M., J. L. Benovic und G. L. Stiles (1995). "Agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the rat A3 adenosine receptor. Evidence for a G-protein-coupled receptor kinase- mediated mechanism." J Biol Chem: 29607-13.
- Palmer, T. M. und G. L. Stiles (1995). "Adenosine receptors." Neuropharmacology: 683-94.
- Palmer, T. M. und G. L. Stiles (1999). "Stimulation of A(2A) adenosine receptor phosphorylation by protein kinase C activation: evidence for regulation by multiple protein kinase C isoforms." Biochemistry: 14833-42.
- Pandey, S. C. (1998). "Neuronal signaling systems and ethanol dependence." Mol Neurobiol: 1-15.

- Pauwels, R. A. und G. F. Joos (1995). "Characterization of the adenosine receptors in the airways." Arch Int Pharmacodyn Ther: 151-60.
- Peng, M. und E. Lundgren (1993). "Transient expression of the Epstein-Barr virus LMP1 gene in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells, T cells, and hematopoietic cell lines: cell-type-independent-induction of CD23, CD21, and ICAM-1." Leukemia: 104-12.
- Peng, L., C. J. Bradley und J. S. Wiley (1998). "[Apoptosis of leukemic lymphocytes mediated by purinergic P2z receptors]." Zhonghua Yi Xue Za Zhi: 508-11.
- Peterfreund, R. A., E. K. Gies und J. S. Fink (1997). "Protein kinase C regulates adenosine A2a receptor mRNA expression in SH- SY5Y cells." Eur J Pharmacol: 71-80.
- Peyot, M. L., A. P. Gadeau, F. Dandre, I. Belloc, F. Dupuch und C. Desgranges (2000). "Extracellular adenosine induces apoptosis of human arterial smooth muscle cells via A(2b)-purinoceptor." Circ Res: 76-85.
- Pierce, K. D., T. J. Furlong, L. A. Selbie und J. Shine (1992). "Molecular cloning and expression of an adenosine A2b receptor from human brain." Biochem Biophys Res Commun: 86-93.
- Port, J. D., J. R. Hadcock und C. C. Malbon (1992). "Cross-regulation between G-protein-mediated pathways. Acute activation of the inhibitory pathway of adenylylcyclase reduces beta 2-adrenergic receptor phosphorylation and increases beta-adrenergic responsiveness." J Biol Chem: 8468-72.
- Prasad, A. S. (1998). "Zinc and immunity." Mol Cell Biochem: 63-9.
- Probst, W. C., L. A. Snyder, D. I. Schuster, J. Brosius und S. C. Sealfon (1992). "Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily." DNA Cell Biol: 1-20.
- Reed, J. C. (1998). "Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia." Semin Oncol: 11-8.
- Reeves, J. J., C. A. Jones, M. J. Sheehan, C. J. Vardey und C. J. Whelan (1997). "Adenosine A3 receptors promote degranulation of rat mast cells both in vitro and in vivo." Inflamm Res: 180-4.
- Ren, H. und G. L. Stiles (1994). "Characterization of the human A1 adenosine receptor gene. Evidence for alternative splicing." J Biol Chem: 3104-10.
- Resta, R., Y. Yamashita und L. F. Thompson (1998). "Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73." Immunol Rev: 95-109.
- Ribeiro, J. A., R. A. Cunha, P. Correia-de-Sa und A. M. Sebastiao (1996). "Purinergic regulation of acetylcholine release." Prog Brain Res: 231-41.

- Ribeiro, J. A. (1999). "Adenosine A2A receptor interactions with receptors for other neurotransmitters and neuromodulators." Eur J Pharmacol: 101-13.
- Robertson, L. E., S. Chubb, R. E. Meyn, M. Story, R. Ford, W. N. Hittelman und W. Plunkett (1993). "Induction of apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia by 2-chloro-2'-deoxyadenosine and 9-beta-D-arabinosyl-2-fluoroadenine." Blood: 143-50.
- Robertson, M. J., T. J. Manley, G. Pichert, C. Cameron, K. J. Cochran, H. Levine und J. Ritz (1995). "Functional consequences of APO-1/Fas (CD95) antigen expression by normal and neoplastic hematopoietic cells." Leuk Lymphoma: 51-61.
- Romano, F. D. und J. G. Dobson, Jr. (1996). "Adenosine attenuation of isoproterenol-stimulated adenylyl cyclase activity is enhanced with aging in the adult heart." Life Sci: 493-502.
- Rosi, F., A. B. Agostinho, F. Carlucci, L. Zanoni, B. Porcelli, E. Marinello, P. Galieni und A. Tabucchi (1998). "Behaviour of human lymphocytic isoenzymes of 5'-nucleotidase." Life Sci: 2257-66.
- Roy, B., J. Beamon, E. Balint und D. Reisman (1994). "Transactivation of the human p53 tumor suppressor gene by c-Myc/Max contributes to elevated mutant p53 expression in some tumors." Mol Cell Biol: 7805-15.
- Rudolphi, K. A. und P. Schubert (1997). "Modulation of neuronal and glial cell function by adenosine and neuroprotection in vascular dementia." Behav Brain Res: 123-8.
- Sajjadi, F. G., K. Takabayashi, A. C. Foster, R. C. Domingo und G. S. Firestein (1996). "Inhibition of TNF-alpha expression by adenosine: role of A3 adenosine receptors." J Immunol: 3435-42.
- Sakai, T. und T. Honjo (1997). "[Transcriptional activity of EBNA2 through RBP-J]." Nippon Rinsho: 293-8.
- Salim, H., S. Ferre, A. Dalal, R. A. Peterfreund, K. Fuxe, J. D. Vincent und P. M. Lledo (2000). "Activation of adenosine A1 and A2A receptors modulates dopamine D2 receptor-induced responses in stably transfected human neuroblastoma cells." J Neurochem: 432-9.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning. A laboratory manual." Cold spring Harbor Laboratory Press.
- Sampath, D. und W. Plunkett (2000). "The role of c-Jun kinase in the apoptotic response to nucleoside analogue-induced DNA damage." Cancer Res: 6408-15.
- Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A: 5463-7.

- Sarrio, S., V. Casado, M. Escriche, F. Ciruela, J. Mallol, E. I. Canela, C. Lluís und R. Franco (2000). "The heat shock cognate protein hsc73 assembles with A(1) adenosine receptors to form functional modules in the cell membrane." Mol Cell Biol: 5164-74.
- Saura, C. A., J. Mallol, E. I. Canela, C. Lluís und R. Franco (1998). "Adenosine deaminase and A1 adenosine receptors internalize together following agonist-induced receptor desensitization." J Biol Chem: 17610-7.
- Schuh, K., A. Avots, H. P. Tony, E. Serfling und C. Kneitz (1996). "Nuclear NF-ATp is a hallmark of unstimulated B cells from B-CLL patients." Leuk Lymphoma: 583-92.
- Seidel, M. G., M. Klinger, M. Freissmuth und C. Holler (1999). "Activation of mitogen-activated protein kinase by the A(2A)-adenosine receptor via a rap1-dependent and via a p21(ras)-dependent pathway." J Biol Chem: 25833-41.
- Seligmann, C., C. Kupatt, B. F. Becker, S. Zahler und S. Beblo (1998). "Adenosine endogenously released during early reperfusion mitigates postischemic myocardial dysfunction by inhibiting platelet adhesion." J Cardiovasc Pharmacol: 156-63.
- Sexl, V., G. Mancusi, C. Holler, E. Gloria-Maercker, W. Schutz und M. Freissmuth (1997). "Stimulation of the Mitogen-activated Protein Kinase via the A2A-Adenosine Receptor in Primary Human Endothelial Cells." J. Biol. Chem.: 5792-5799.
- Shaw, S., W. Gilks und G. Luce (1994). „Leukocyte Typing V.“ Oxford University Press.
- Shneyvays, V., K. A. Jacobson, A. H. Li, H. Nawrath, T. Zinman, A. Isaac und A. Shainberg (2000). "Induction of apoptosis in rat cardiocytes by A3 adenosine receptor activation and its suppression by isoproterenol." Exp Cell Res: 111-26.
- Sitkovsky, M. V. (1998). "Extracellular purines and their receptors in immunoregulation. Review of recent advances." Nippon Ika Daigaku Zasshi: 351-7.
- Slomiany, B. L., J. Piotrowski, E. Piotrowski und A. Slomiany (1998). "Activation of apoptotic caspase-3 and nitric oxide synthase-2 in buccal mucosa with chronic alcohol ingestion." Biochem Mol Biol Int: 1199-209.
- Soderling, T. R. (1999). "The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade." Trends Biochem Sci: 232-6.
- Song, W. J., T. Tkatch und D. J. Surmeier (2000). "Adenosine receptor expression and modulation of Ca(2+) channels in rat striatal cholinergic interneurons." J Neurophysiol: 322-32.
- Sperlagh, B., G. Zsilla und E. S. Vizi (2001). "K(ATP) channel blockers selectively interact with A(1)-adenosine receptor mediated modulation of acetylcholine release in the rat hippocampus." Brain Res: 63-70.

- Spychala, J. (2000). "Tumor-promoting functions of adenosine." Pharmacol Ther: 161-73.
- Srivastava, R. K., C. Y. Sasaki, J. M. Hardwick und D. L. Longo (1999). "Bcl-2-mediated drug resistance: inhibition of apoptosis by blocking nuclear factor of activated T lymphocytes (NFAT)-induced Fas ligand transcription." J Exp Med: 253-65.
- Steffan, N. M., G. D. Bren, B. Frantz, M. J. Tocci, E. A. O'Neill und C. V. Paya (1995). "Regulation of I κ B alpha phosphorylation by PKC- and Ca(2+)-dependent signal transduction pathways." J Immunol: 4685-91.
- Stilgenbauer, S., P. Liebisch, M. R. James, M. Schroder, B. Schlegelberger, K. Fischer, M. Bentz, P. Lichter und H. Dohner (1996). "Molecular cytogenetic delineation of a novel critical genomic region in chromosome bands 11q22.3-923.1 in lymphoproliferative disorders." Proc Natl Acad Sci U S A: 11837-41.
- Strobl, L. J., H. Hofelmayr, C. Stein, G. Marschall, M. Brielmeier, G. Laux, G. W. Bornkamm und U. Zimmer-Strobl (1997). "Both Epstein-Barr viral nuclear antigen 2 (EBNA2) and activated Notch1 transactivate genes by interacting with the cellular protein RBP-J kappa." Immunobiology: 299-306.
- Strohmeier, G. R., W. I. Lencer, T. W. Patapoff, L. F. Thompson, S. L. Carlson, S. J. Moe, D. K. Carnes, R. J. Mersny und J. L. Madara (1997). "Surface expression, polarization, and functional significance of CD73 in human intestinal epithelia." J Clin Invest: 2588-601.
- Thompson, L. F. (1985). "Ecto-5'-nucleotidase can provide the total purine requirements of mitogen-stimulated human T cells and rapidly dividing human B lymphoblastoid cells." J Immunol: 3794-7.
- Thompson, A. A., J. A. Talley, H. N. Do, H. L. Kagan, L. Kunkel, J. Berenson, M. D. Cooper, A. Saxon und R. Wall (1997). "Aberrations of the B-cell receptor B29 (CD79b) gene in chronic lymphocytic leukemia." Blood: 1387-94.
- Tomura, H., H. Itoh, K. Sho, K. Sato, M. Nagao, M. Ui, Y. Kondo und F. Okajima (1997). "Betagamma subunits of pertussis toxin-sensitive G proteins mediate A1 adenosine receptor agonist-induced activation of phospholipase C in collaboration with thyrotropin. A novel stimulatory mechanism through the cross-talk of two types of receptors." J Biol Chem: 23130-7.
- Tucker, A. L., A. S. Robeva, H. E. Taylor, D. Holetton, M. Bockner, K. R. Lynch und J. Linden (1994). "A1 adenosine receptors. Two amino acids are responsible for species differences in ligand recognition." J Biol Chem: 27900-6.
- Tuyt, L. M., W. H. Dokter, K. Birkenkamp, S. B. Koopmans, C. Lummen, W. Kruijer und E. Vellenga (1999). "Extracellular-regulated kinase 1/2, Jun N-terminal kinase, and c-Jun are involved in NF-kappa B-dependent IL-6 expression in human monocytes." J Immunol: 4893-902.

- van Biesen, T., B. E. Hawes, D. K. Luttrell, K. M. Krueger, K. Touhara, E. Porfiri, M. Sakaue, L. M. Luttrell und R. J. Lefkowitz (1995). "Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway." Nature: 781-4.
- Van Den Neste, E., A. Delannoy, B. Vandercam, A. Bosly, A. Ferrant, P. Mineur, L. Montfort, P. Martiat, N. Straetmans, B. Filleul und J. L. Michaux (1996). "Infectious complications after 2-chlorodeoxyadenosine therapy." Eur J Haematol: 235-40.
- Vassallo, R. und J. J. Lipsky (1998). "Theophylline: recent advances in the understanding of its mode of action and uses in clinical practice." Mayo Clin Proc: 346-54.
- Vinten-Johansen, J., V. H. Thourani, R. S. Ronson, J. E. Jordan, Z. Q. Zhao, M. Nakamura, D. Velez und R. A. Guyton (1999). "Broad-spectrum cardioprotection with adenosine." Ann Thorac Surg: 1942-8.
- von Lubitz, D. K., W. Ye, J. McClellan und R. C. Lin (1999). "Stimulation of adenosine A3 receptors in cerebral ischemia. Neuronal death, recovery, or both?" Ann N Y Acad Sci: 93-106.
- von Lubitz, D. K. (1999). "Adenosine and cerebral ischemia: therapeutic future or death of a brave concept?" Eur J Pharmacol: 85-102.
- Watanabe, T., T. Hotta, A. Ichikawa, T. Kinoshita, H. Nagai, T. Uchida, T. Murate und H. Saito (1994). "The MDM2 oncogene overexpression in chronic lymphocytic leukemia and low-grade lymphoma of B-cell origin." Blood: 3158-65.
- Werner, C. A., H. Dohner, S. Joos, L. H. Trumper, M. Baudis, T. F. Barth, G. Ott, P. Moller, P. Lichter und M. Bentz (1997). "High-level DNA amplifications are common genetic aberrations in B-cell neoplasms." Am J Pathol: 335-42.
- Whitmarsh, A. J. und R. J. Davis (1996). "Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways." J Mol Med: 589-607.
- Wu, Y. N., N. B. Mercuri und S. W. Johnson (1995). "Presynaptic inhibition of gamma-aminobutyric acidB-mediated synaptic current by adenosine recorded in vitro in midbrain dopamine neurons." J Pharmacol Exp Ther: 576-81.
- Xaus, J., A. F. Valledor, M. Cardo, L. Marques, J. Beleta, J. M. Palacios und A. Celada (1999). "Adenosine inhibits macrophage colony-stimulating factor-dependent proliferation of macrophages through the induction of p27kip-1 expression." J Immunol: 4140-9.
- Yano, S., H. Tokumitsu und T. R. Soderling (1998). "Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway." Nature: 584-7.

- Yao, Z. und G. J. Gross (1993). "Glibenclamide antagonizes adenosine A1 receptor-mediated cardioprotection in stunned canine myocardium." Circulation: 235-44.
- Zhao, Q. und F. S. Lee (1999). "Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinases 2 and 3 activate nuclear factor-kappaB through IkappaB kinase-alpha and IkappaB kinase-beta." J Biol Chem: 8355-8.
- Zhao, T., L. Xi, J. Chelliah, J. E. Levasseur und R. C. Kukreja (2000). "Inducible nitric oxide synthase mediates delayed myocardial protection induced by activation of adenosine A(1) receptors: evidence from gene- knockout mice." Circulation: 902-7.
- Zidek, Z. (1999). "Adenosine - cyclic AMP pathways and cytokine expression." Eur Cytokine Netw: 319-28.
- Zimmermann, H. (1992). "5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects." Biochem J: 345-65.
- Zimmermann, H. (1996). "Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system." Prog Neurobiol: 589-618.
- Zwiebel, J. A. und B. D. Cheson (1998). "Chronic lymphocytic leukemia: staging and prognostic factors." Semin Oncol: 42-59.

9 Anhang

9.1 Kodierende Sequenzen der untersuchten Gene

Startcodons sind fett und unterstrichen dargestellt. Relevante RT-PCR- oder Northern Blotsonden-Primersequenzen wurden unterstrichen.

9.1.1 A1AdoR

Genbank/EMBL „Accession-Number“ L22214

5´ <u>ATG</u> CCGCCCT	CCATCTCAGC	TTTCCAGGCC	GCCTACATCG	GCATCGAGGT	50
GCTCATCGCC	CTGGTCTCTG	TGCCCCGGAA	CGTGCTGGTG	ATCTGGGCGG	100
TGAAGGTGAA	CCAGGCGCTG	CGGGATGCCA	<u>CCTTCTGCTT</u>	<u>CATCGTGTCTG</u>	150
<u>CTGGCGGTGG</u>	CTGATGTGGC	CGTGGGTGCC	CTGGTCATCC	CCCTCGCCAT	200
CCTCATCAAC	ATTGGGCCAC	AGACCTACTT	CCACACCTGC	CTCATGGTTG	250
CCTGTCCGGT	CCTCATCCTC	ACCCAGAGCT	CCATCCTGGC	CCTGCTGGCA	300
ATTGCTGTGG	ACCGCTACCT	CCGGGTCAAG	ATCCCTCTCC	GGTACAAAGAT	350
GGTGGTGACC	CCCCGGAGGG	CGGCGGTGGC	CATAGCCGGC	TGCTGGATCC	400
TCTCCTTCGT	GGTGGGACTG	ACCCCTATGT	TTGGCTGGAA	CAATCTGAGT	450
GCGGTGGAGC	GGGCCTGGGC	AGCCAACGGC	AGCATGGGGG	AGCCCGTGAT	500
CAAGTGCAG	TTCGAGAAGG	TCATCAGCAT	GGAGTACATG	GTCTACTTCA	550
ACTTCTTTGT	GTGGGTGCTG	CCCCCGCTTC	TCCTCATGGT	CCTCATCTAC	600
CTGGAGGTCT	TCTACCTAAT	CCGCAAGCAG	<u>CTCAACAAGA</u>	<u>AGGTGTCGGC</u>	650
CTCCTCCGGC	GACCCGCAGA	AGTACTATGG	<u>GAAGGAGCTG</u>	<u>AAGATCGCCA</u>	700
AGTCGCTGGC	CCTCATCCTC	TTCTCTTTTG	CCCTCAGCTG	GCTGCCTTTG	750
CACATCCTCA	ACTGCATCAC	CCTCTTCTGC	CCGTCCTGCC	ACAAGCCCAG	800
CATCCTTACC	TACATTGCCA	TCTTCCTCAC	GCACGGCAAC	TCGGCCATGA	850
ACCCCATTTG	CTATGCCTTC	CGCATCCAGA	AGTTCCGCGT	CACCTTCCTT	900
AAGATTTGGA	ATGACCATTT	CCGCTGCCAG	CCTGCACCTC	CCATTGACGA	950
GGATCTCCCA	GAAGAGAGGC	CTGATGACTA	G 3´		981

9.1.2 A2aAdoR

Genbank/EMBL „Accession-Number“ U40770/1

5´ <u>ATG</u> CCCATCA	TGGGCTCCTC	<u>GGTGATACATC</u>	ACGGTGGAGC	TGGCCATTGC	50
TGTGCTGGCC	ATCCTGGGCA	ATGTGCTGGT	GTGCTGGGCC	GTGTGGCTCA	100
ACAGCAACCT	GCAGAACGTC	ACCAACTACT	TTGTGGTGTC	ACTGGCGGCG	150
GCCGACATCG	CAGTGGGTGT	GCTCGCCATC	CCCTTTGCCA	TCACCATCAG	200
CACCGGGTTC	TGCGCTGCCT	GCCACGGCTG	CCTCTTCATT	GCCTGCTTCG	250
TCCTGGTCCT	CACGCAGAGC	TCCATCTTCA	GTCTCCTGGC	CATCGCCATT	300
GACCGCTACA	TTGCCATCCG	CATCCCGCTC	CGTACAATGG	CTTGGTGACC	350
GGCACGAGGG	CTAAGGGCAT	CATTGCCATC	TGCTGGGTGC	TGTCGTTTGC	400
CATCGGCCTG	ACTCCCATGC	TAGGTTGGAA	CAACTGCGGT	CAGCCAAAGG	450
AGGGCAAGAA	CCACTCCCAG	GGCTGCGGGG	AGGGCCAAGT	<u>GGCCTGTCTC</u>	500
<u>TTTGAGGATG</u>	TGGTCCCCAT	GAACTACATG	GTGTACTTCA	ACTTCTTTGC	550
CTGTGTGCTG	GTGCCCCTGC	TGCTCATGCT	GGGTGTCTAT	TTGCGGATCT	600
TCCTGGCGGC	GCGACGACAG	CTGAAGCAGA	TGGAGAGCCA	GCCTCTGCCG	650
GGGGAGCGGG	CACGGTCCAC	ACTGCAGAA	GAGGTCCATG	CTGCCAAGTC	700
ACTGGCCATC	ATTGTGGGGC	TCTTTGCCCT	CTGCTGGCTG	CCCCTACACA	750
TCATCAACTG	CTTCACTTTC	TTCTGCCCCG	ACTGCAGCCA	CGCCCCCTCTC	800
TGGCTCATGT	ACCTGGCCAT	CGTCTCTCC	CACACCAATT	CGGTTGTGAA	850
TCCCTTCATC	TACGCCTACC	GTATCCGCGA	GTTCCGCCAG	ACCTTCCGCA	900
AGATCATTCG	CAGCCACGTC	CTGAGGCAGC	AAGAACCTTT	CAAGGCAGCT	950
GGCACCAAGT	CCCGGGTCTT	GGCAGCTCAT	GGCAGTGACG	GAGAGCAGGT	1000
CAGCCTCCGT	CTCAACGGCC	ACCCGCCAGG	AGTGTGGGCC	AACGGCAGTG	1050
CTCCCCACCC	TGAGCGGAGG	CCCAATGGCT	ATGCCCTGGG	GCTGGTGAGT	1100
GGAGGGAGTG	CCCAAGAGTC	CCAGGGGAAC	ACGGGCCTCC	CAGACGTGGA	1150
GCTCCTTAGC	CATGAGCTCA	AGGGAGTGTG	CCCAGAGCCC	CCTGGCCTAG	1200
ATGACCCCTT	GGCCAGGAT	GGAGCAGGAG	TGTCCTGA	3´	1238

9.1.3 A2bAdoR

Genbank/EMBL „Accession-Number“ X68487

```

5´ ATGCTGCTGG AGACACAGGA CGCGCTGTAC GTGGCGCTGG AGCTGGTTCAT      50
CGCCGCGCTT TCGGTGGCGG GCAACGTGCT GGTGTGCGCC GCGGTGGGCA      100
CGGCGAACAC TCTGCAGACG CCCACCAACT ACTTCCTGGT GTCCCTGGCT      150
GCGGCCGACG TGGCCGTGGG GCTCTTCGCG ATCCCTTTG CCATCACCAT      200
CAGCCTGGGC TTCTGCACTG ACTTCTACGG CTGCCCTCTT CTGCGCTGCT      250
TCGTGCTGGT GCTCACGCAG AGCTCCATCT TCAGCCTTCT GGCCGTGGCA      300
GTCGACAGAT ACCTGGCCAT CTGTGTCCCG CTCAGGTATA AAAGTTTGGT      350
CACGGGGACC CGAGCAAGAG GGGTCATTGC TGTCTCTGG GTCCCTTGCC      400
TTGGCATCGG ATTGACTCCA TTCCTGGGGT GGAACAGTAA AGACAGTGCC      450
ACCAACAACT GCACAGAACC CTGGGATGGA ACCACGAATG AAAGCTGCTG      500
CCTTGTGAAG TGTCTCTTTG AGAATGTGGT CCCCATGAGC TACATGGTAT      550
ATTTCAATTT CTTTGGGTGT GTTCTGCCCC CACTGCTTAT AATGCTGGTG      600
ATCTACATTA AGATCTTCCT GGTGGCCTGC AGGCAGCTTC AGCGCACTGA      650
GCTGATGGAC CACTCGAGGA CCACCCTCCA GCGGGAGATC CATGCAGCCA      700
AGTCACTGGC CATGATTGTG GGGATTTTTG CCCTGTGCTG GTTACCTGTG      750
CATGCTGTTA ACTGTGTCAC TCTTTTCCAG CCAGCTCAGG GTAAAAATAA      800
GCCCAAGTGG GCAATGAATA TGGCCATTCT TCTGTACAT GCCAATTCAG      850
TTGTCAATCC CATTGTCTAT GCTTACCGGA ACCGAGACTT CCGCTACACT      900
TTTCACAAAA TTATCTCCAG GTATCTTCTC TGCCAAGCAG ATGTCAAGAG      950
TGGGAATGGT CAGGCTGGGG TACAGCCTGC TCTCGGTGTG GGCCTATG 3´      998

```

9.1.4 A3AdoR

Genbank/EMBL „Accession-Number“ L20463

```

5´ ATGCCCAACA ACAGCACTAC TCTGTCAATTG GCCAATGTTA CCTACATCAC      50
CATGGAAATT TTCATTGGAC TCTGCGCCAT AGTGGGCAAC GTGCTGGTCA      100
TCTGCGTGGT CAAGCTGAAC CCCAGCCTGC AGACCACCAC CTTCTATTTT      150
ATTGTCTCTC TAGCCCTGGC TGACATTGCT GTTGGGGTGC TGGTCATGCC      200
TTTGGCCATT GTTGTGAGCC TGGGCATCAC AATCCACTTC TACAGCTGCC      250
TTTTTATGAC TTGCCTACTG CTTATCTTTA CCCACGCCTC CATCATGTCC      300
TTGCTGGCCA TCGCTGTGGA CCGATACTTG CGGGTCAAGC TTACCGTCAG      350
ATACAAGAGG GTCACCACTC ACAGAAGAAT ATGGCTGGCC CTGGGCCCTTT      400
GCTGGCTGGT GTCATTCTCTG GTGGGATTGA CCCCCATGTT TGGCTGGAAC      450
ATGAACTGA CCTCAGAGTA CCACAGAAAT GTCACCTTCC TTTCATGCCA      500
ATTTGTTTCC GTCATGAGAA TGGACTACAT GGTATACTTC AGCTTCCTCA      550
CCTGGATTTT CATCCCCCTG GTTGTGATGT GCGCCATCTA TCTTGACATC      600
TTTTTACATA TTCGGAACAA ACTCAGTCTG AACTTATCTA ACTCCAAAGA      650
GACAGGTGCA TTTTATGGAC GGGAGTTCAA GACGGCTAAG TCCTTGTTTC      700
TGGTTCTTTT CTTGTTTGCT CTGTGATGGC TGCCTTTATC TATCATCAAC      750
TGCATCATCT ACTTTAATGG TGAGGTACCA CAGCTTGTGC TGTACATGGG      800
CATCCTGCTG TCCCATGCCA ACTCCATGAT GAACCCATC GTCTATGCCT      850
ATAAAATAAA GAAGTTCAAG GAAACCTACC TTTTGATCCT CAAAGCCTGT      900
GTGGTCTGCC ATCCCTCTGA TTCTTTGGAC ACAAGCATTG AGAAGAATTC      950
TGAGTAG 3´      957

```

9.1.5 CD73

Genbank/EMBL „Accession-Number“ NM002526

```

5´ GCACTCGCCC GGCTCGCCCG CTTTCGCACC CAGTTCACGC GCCACAGCTA      50
TGTGTCCCCG AGCCGCGCGG GCGCCCGCGA CGCTACTCCT CGCCCTGGGC      100
GCGGTGCTGT GGCCTGCGGC TGGCGCCTGG GAGCTTACGA TTTTGACAC      150
CAACGACGTG CACAGCCGGC TGGAGCAGAC CAGCGAGGAC TCCAGCAAGT      200
GCGTCAACGC CAGCCGCTGC ATGGGTGGCG TGGCTCGGCT CTTACCAAG      250
GTTTCAGCAGA TCCGCCGCGC CGAACCCAAC GTGCTGCTGC TGGACGCCGG      300
CGACCAGTAC CAGGGCACTA TCTGGTTCAC CGTGTAACAAG GGCGCCGAGG      350
TGGCGCACTT CATGAACGCC CTGCGCTACG ATGCCATGGC ACTGGGAAAT      400
CATGAATTTG ATAATGGTGT GGAAGGACTG ATCGAGCCAC TCCTCAAAGA      450
GGCCAAATTT CCAATTCTGA GTGCAAACAT TAAAGCAAAG GGGCCACTAG      500

```

CATCTCAAAT	ATCAGGACTT	TATTTGCCAT	ATAAAGTTCT	TCCTGTTGGT	550
GATGAAGTTG	TGGGAATCGT	TGGATACACT	TCCAAAGAAA	CCCCTTTTCT	600
CTCAAATCCA	GGGACAAATT	TAGTGTTTGA	AGATGAAATC	ACTGCATTAC	650
AACCTGAAGT	AGATAAGTTA	AAAACCTCTA	ATGTGAACAA	AATTATTGCA	700
CTGGGACATT	CGGGTTTTGA	AATGGATAAA	CTCATCGCTC	AGAAAAGTGAG	750
GGGTGTGGAC	GTCGTGGTGG	GAGGACACTC	CAACACATTT	CTTTACACAG	800
GCAATCCACC	TTCCAAAGAG	GTGCCTGCTG	GGAAGTACCC	ATTCATAGTC	850
ACTTCTGATG	ATGGGCGGAA	GGTTCCTGTA	GTCCAGGCCT	ATGCTTTTGG	900
CAAATACCTA	GGCTATCTGA	AGATCGAGTT	TGATGAAAGA	GGAAACGTCA	950
TCTCTTCCCA	TGGAAATCCC	ATTCTTCTAA	ACAGCAGCAT	TCCTGAAGAT	1000
CCAAGCATAA	AAGCAGACAT	TAACAAATGG	AGGATAAAAT	TGGATAAATTA	1050
TTCTACCCAG	GAATTAGGGA	AAACAATTGT	CTATCTGGAT	GGCTCCTCTC	1100
AATCATGCCG	CTTTAGAGAA	TGCAACATGG	GCAACCTGAT	TTGTGATGCA	1150
ATGATTAACA	ACAACCTGAG	ACACACGGAT	GAAATGTTCT	GGAACCACGT	1200
ATCCATGTGC	ATTTTAAATG	GAGGTGGTAT	CCGGTCGCCC	ATTGATGAAC	1250
GCAACAATGG	CACAATTACC	TGGGAGAACC	TGGCTGCTGT	ATTGCCCTTT	1300
GGAGGCACAT	TTGACCTAGT	CCAGTTAAAA	GGTTCACCC	TGAAGAAGGC	1350
CTTTGAGCAT	AGCGTGCACC	GCTACGGCCA	GTCCACTGGA	GAGTTCCTGC	1400
AGGTGGGCGG	AATCCATGTG	GTGTATGATC	TTTCCCGAAA	ACCTGGAGAC	1450
AGAGTAGTCA	AATTAGATGT	TCTTTGCACC	AAGTGTCGAG	TGCCCAGTTA	1500
TGACCCTCTC	AAAATGGACG	AGGTATATAA	GGTGATCCTC	CCAAACTTCC	1550
TGGCCAATGG	TGGAGATGGG	TTCCAGATGA	TAAAAGATGA	ATTATTAAGA	1600
CATGACTCTG	GTGACCAAGA	TATCAACGTG	GTTTCTACAT	ATATCTCCAA	1650
AATGAAAGTA	ATTTATCCAG	CAGTTGAAGG	TGGATCAAG	TTTTCCACAG	1700
GAAGTCACTG	CCATGGAAGC	TTTTCTTTAA	TATTTCTTTC	ACTTTGGGCA	1750
GTGATCTTTG	TTTTATACCA	ATAGCCAAAA	ATTCTCCTTG	CCTTTAATGT	1800
GTGAAACTGC	ATTTTTTCAA	GTGAGATTCA	AATCTGCCTT	TTAGGACCTG	1850
GCTTTGTGAC	AGCAAAAACC	ATCTTTACAG	GCTCCTAGAA	GCTGAAGGTT	1900
AGAGCATTAT	AAAATGAAGA	GACAGACATG	ATTACTCAGG	GTCAGCAACC	1950
TAGTGAGTTA	GAAAAAAAAT	TAACATAGGG	CCCTATAAAG	AGAAAAGCCAA	2000
CTATGTTAAG	TTTACGTGTC	CAAATTTTAA	TGAAATTTTA	CTAACAAATT	2050
TAAACCATAT	TTTTCTTCTT	CATATCCATT	TCTAATCCAT	CAAACAGCTT	2100
ATGTTTACAT	AAAATTTTAT	CATTACAAAG	GAAGTTTTAA	GCACACTGTC	2150
TCATTTGATA	TCCACAACCT	ATTTTTGGTA	GGAAAGAGAG	ATGTTTTTCC	2200
CACCTGTCAG	ATGAAAAAAC	TGAAGCTCAA	AAAGGGTTGA	CTTGACCATA	2250
CAGCTAATGC	TGACAGATCC	AAGACCTAGA	CCTAGGTCTT	TTGAACTCAA	2300
GTCCAGCATT	CTCAACTATA	TCAAGTTACT	GTTCAGAATA	CTTAATATCT	2350
CCTCTCTTCA	TAATTATCAA	TAGCCCCAAG	CTCATGGATG	ACAAATCTCT	2400
GCTTTATTTT	TTGTCTCTAT	TTTTTCACTT	TATAGCTCCT	GTTATAATAG	2450
CAAGTTTAAT	GGTATAAACA	CAGGATACCA	TCCTCTCTTG	CAACACCCAT	2500
GTGCCTTTGA	TGAGTCAGGT	AGCAAGCTGT	AGTAGATAAT	GAGAAAGGCC	2550
AGAGGCTGCA	AAGACAGTCA	AAGGACACGA	GAGAAAGGAA	GGGGAAGAAC	2600
AGGACTCCAG	GACTGTTTTA	TATTATAGAA	AAGCAAGAGC	TAAAGAGCAT	2650
TTACTACATG	TAAACAGATA	CTTGTTAAGC	ATAGTGCCTG	ACACACGGCA	2700
TTAGCTGTTA	TTTTATGAGA	TTCCATCAGC	TCTGCCTCTG	TCCTCTTTCT	2750
TCTAACATGA	AGGTATCATG	AGAAGAGAAC	CTTCTAACAT	AAGCTGTAAT	2800
TCTAAACCTG	CACCTGTCCC	TCTCCAGCAA	GAGGCTAGCA	CTGAATTCAT	2850
TCTACTCATA	CTACACACCC	AGTTATGGAA	TGTCCAGAGT	TCTCGAAGAA	2900
AATAAATGAC	TTTAGGAAGA	GGTATACATT	TTTTAAGTCG	CTCTGCCTCC	2950
AAATCTGAAC	AGTCACTGTA	AATCATTCTT	AAGCCCAGAT	ATGAGAACTT	3000
CTGCTGGAAA	GTGGGACCCT	CTGAGTGGGT	GGTCAGAAAA	TACCCATGCT	3050
GATGAAATGA	CCTATGCCCA	AAGAACAAAT	ACTTAACGTG	GGAGTGGAAC	3100
CACATGAGCC	TGCTCAGCTC	TGCATAAGTA	ATTCAAGAAA	TGGGAGGCTT	3150
CACCTTAAAA	ACAGTGTGCA	AATGGCAGCT	AGAGGTTTTG	ATAGGAAGTA	3200
TGTTTTGTTT	TTAGTGTTTA	CAAATATTAA	GTACTCTTGA	TACAAAAATAT	3250
ACTTTTAAAC	TTCATAACCT	TTTTATAAAA	GTTGTTGCAG	CAAAAAATAA	3300
GCCTCGGTTC	TATGCATATA	TGGATTGCTA	TAAAAAATGT	CAATAAGATT	3350
GTACAAGGAA	AATTAGAGAA	AGTCACATTT	AGGGTTTATT	TTTTACACTT	3400
GGCCAGTAAA	ATAGGGTAAA	TCCTATTAGA	AATTTTTTAA	AGAACTTTTT	3450
TTAAGTTTCC	TAAATCTGTG	TGTGTATTGT	GAAGTGGTAT	AAGAAATGAC	3500
TTTGAACCAC	TTTGCAATTG	TAGATTCCCA	ACAATAAAAT	TGAAGAT 3'	3547

9.1.6 ADA

Genbank/EMBL „Accession-Number“ XM029809

```

5´ ACCGCTGGCC CCAGGGAAAG CCGAGCGGCC ACCGAGCCGG CAGAGACCCA      50
   CCGAGCGGCG GCGGAGGGAG CAGCGCCGGG GCGCACGAGG GCACCAATGGC      100
   CCAGACGCCC GCCTTCGACA AGCCCAAAGT AGAACTGCAT GTCCACCTAG      150
   ACGGATCCAT CAAGCCTGAA ACCATCTTAT ACTATGGCAG GAGGAGAGGG      200
   ATCGCCCTCC CAGCTAACAC AGCAGAGGGG CTGCTGAACG TCATTGGCAT      250
   GGACAAGCCG CTCACCTTTC CAGACTTCCT GGCCAAATTT GACTACTACA      300
   TGCCTGCTAT CGCGGGCTGC CGGGAGGCTA TCAAAAGGAT CGCCTATGAG      350
   TTTGTAGAGA TGAAGGCCAA AGAGGGCGTG GTGTATGTGG AGGTGCGGTA      400
   CAGTCCGCAC CTGCTGGCCA ACTCCAAAGT GGAGCCAATC CCCTGGAACC      450
   AGGCTGAAGG GGACCTCACC CCAGACGAGG TGGTGGCCCT AGTGGGCCAG      500
   GGCCTGCAGG AGGGGGAGCG AGACTTCGGG GTCAAGGCCG GTTCCATCCT      550
   GTGCTGCATG CGCCACCAGC CCAACTGGTC CCCCAGGTTG GTGGAGCTGT      600
   GTAAGAACTA CCAGCAGCAG ACCGTGGTAG CCATTGACCT GGCTGGAGAT      650
   GAGACCATCC CAGGAAGCAG CCTCTTGCTT GGACATGTCC AGGCCTACCA      700
   GGAGGCTGTG AAGAGCGGCA TTCACCGTAC TGTCCACGCC GGGGAGGTGG      750
   GCTCGGCCGA AGTAGTAAAA GAGGCTGTGG ACATACTCAA GACAGAGCGG      800
   CTGGGACACG GCTACCACAC CCTGGAAGAC CAGGCCCTTT ATAACAGGCT      850
   GCGGCAGGAA AACATGCAC TCGAGATCTG CCCCTGGTCC AGCTACCTCA      900
   CTGGTGCCTG GAAGCCGGAC ACGGAGCATG CAGTCATTCT GCTCAAAAAT      950
   GACCAGGCTA ACTACTCGCT CAACACAGAT GACCCGCTCA TCTTCAAGTC     1000
   CACCCTGGAC ACTGATTACC AGATGACCAA ACGGGACATG GGCTTTACTG     1050
   AAGAGGAGTT TAAAAGGCTG AACATCAATG CGGCCAAATC TAGTTTCCTC     1100
   CCAGAAGATG AAAAGAGGGA GCTTCTCGAC CTGCTCTATA AAGCCTATGG     1150
   GATGCCACCT TCAGCCTCTG CAGGGCAGAA CCTCTGAAGA CGCCACTCCT     1200
   CCAAGCCTTC ACCCTGTGGA GTCACCCCAA CTCTGTGGGG CTGAGCAACA     1250
   TTTTTACATT TATTCCTTCC AAGAAGACCA TGATCTCAAT AGTCAGTTAC     1300
   TGATGCTCCT GAACCCTATG TGTCCATTTC TGCACACACG TATACCTCGG     1350
   CATGGCCGCG TCACTTCTCT GATTATGTGC CCTGGCAGGG ACCAGCGCCC     1400
   TTGCACATGG GCATGGTTGA ATCTGAAACC CTCCTTCTGT GGCAACTTGT     1450
   ACTGAAAATC TGGTGCTCAA TAAAGAAGCC CATGGCTGGT GGCATGC 3´     1497

```

9.1.7 c-myc

Genbank/EMBL „Accession-Number“ K02276*

```

5´ GGGGGCAGAG GGAGCGAGCG GCGGGCCGCC TAGGGTGCAA GAGCCGGGCG      50
   AGCAGAGTTG CGCTGCGGGC GTCCTGGGAA GGGAGTTCCG GAGCCAACAG      100
   GGGGCTTCGC CTCTGGCCCA GCCCTTCCGG AGCCAACAGG GGAATTTCGCC      150
   TCTGGCCAG CCCTCCCGCT GATCCCCCAG TCAGCGGTCC GCAAGCCTTG      200
   CCGCATCCAC GAAACTTTGC CCATACTGCG GGCGTACACT TTGCACTTGA      250
   ACTTACAACA CCCGAGCAAG GACGCGACTC TCCCGACGCG GGGAGACTAT      300
   TCTGCCCAT TGGGGACACT TCCCCGCCGC TGCCAGGACC CGGTTCTCTG      350
   GAAGGCTGTC CTTGAAGCTC CTTAGACGCT GGAGTTTTTT CGGGAAAGTGG      400
   GAAAGCAGCC TCCCGCGACG ATGCCCCCTCA ACGTTAGCTT CACCAACAGG      450
   AACTATGACC TCGACTACGA CTCGGTGCA GCGTATTTCT ACTGCGACGA      500
   GGAGGAGAAC TTCTACCAGC AGCAGCAGCA GAGCGAGCTG CAGCCCCCGG      550
   CGCCGACGCA GGATATCTGG AAGAAATTCT AGCTGCTGCC CACCCCGCCC      600
   CTGTCCCCTA CCGCCCGCTC CGGGCTCTGC TCGCCCTCCT ACGTTGCGGT      650
   CACACCCTTC TCCCTTCGGG GAGACAACGA CGGCGGTGGC GGGAGCTTCT      700
   CCACGGCCGA CCAGCTGGAG ATGGTGACCG AGCTGCTGGG AGGAGACATG      750
   GTGAACCAGA GTTTTCATCTG CGACCCGGAC GACGAGACCT TCATCAAAAA      800
   CATCATCATC CAGGACTGTA TGTGGAGCGG CTTCTCGGCC GCCGCCAAGC      850
   TCGTCTCAGA GAAGCTGGCC TCCTACCAGG CTGCGCGCAA AGACAGCGGC      900
   AGCCCGAACC CCGCCCGCGG CCACAGCGTC TGCTCCACCT CCAGCTTGTA      950
   CCTGCAGGAT CTGAGCGCCG CCGCCTCAGA GTGCATCGAC CCCTCGGTGG     1000
   TCTTCCCCTA CCCTCTCAAC GACAGCAGCT CGCCCAAGTC CTGCGCCTCG     1050
   CAAGACTCCA GCGCCTTCTC TCCGTCTCTG GATTCTCTGC TCTCCTCGAC     1100
   GGAGTCCTCC CCGCAGGGCA GCCCCGAGCC CCTGGTGCTC CATGAGGAGA     1150
   CACCGCCAC CACCAGCAGC GACTCTGAGG AGGAACAAGA AGATGAGGAA     1200
   GAAATCGATG TTGTTTCTGT GGAAAAGAGG CAGGCTCCTG GCAAAAAGGT     1250

```

AGAGTCTGGA	TCACCTTCTG	CTGGAGGCCA	CAGCAAACCT	CCTCACAGCC	1300
CACTGGTCCT	CAAGAGGTGC	CACGTCTCCA	CACATCAGCA	CAACTACGCA	1350
GCGCCTCCCT	CCACTCGGAA	GGACTATCCT	GCTGCCAAGA	GGGTCAAGTT	1400
GGACAGTGTC	AGAGTCCTGA	GACAGATCAG	CAACAACCGA	AAATGCACCA	1450
GCCCCAGGTC	CTCGGACACC	GAGGAGAATG	TCAAGAGGCG	AACACACAAC	1500
GTCTTGGAGC	GCCAGAGGAG	GAACGAGCTA	AAACGGAGCT	TTTTTGCCCT	1550
GCGTGACCAG	ATCCCGGAGT	TGAAAAACAA	TGAAAAGGCC	CCCAAGGTAG	1600
TTATCCTTAA	AAAAGCCACA	GCATACATCC	TGTCCGTCCA	AGCAGAGGAG	1650
CAAAAGCTCA	TTTCTGAAGA	GGACTTGTTG	CGGAAACGAC	GAGAACAGTT	1700
GAAACACAAA	CTTGAACAGC	TACGGAACCT	TTGTGCGTAA	GGAAAAGTAA	1750
GGAAAACGAT	TCCTTCTAAC	AGAAATGTCC	TGAGCAATCA	CCTATGAACT	1800
TGTTTTCAAA	GCATGATCAA	ATGCAACCTC	ACAACCTTGG	CTGAGTCTTG	1850
AGACTGAAAG	ATTTAGCCAT	AATGTAAACT	GCCTCAAATT	GGACTTTGGG	1900
CATAAAAGAA	CTTTTTATGC	TTACCATCTT	TTTTTTTTTCT	TTAACAGATT	1950
TGTATTTAAG	AATTGTTTTT	AAAAAATTTT	AAGATTTACA	CAATGTTTCT	2000
CTGTAAATAT	TGCCATTAAA	TGTAAATAAC	TTTAATAAAA	ACGTTTATAG	2050
CAGTTACACA	GAATTTCAAT	CCTAGTATAT	AGTACCTAGT	ATTATAGGTA	2100
CTATAAACCC	TAATTTTTTTT	TATTTAAGTA	CATTTTGCTT	TTTAAAGTTG	2150
ATTT 3'					2154

*Primer der murinen c-myc-Sequenz entnommen. Wahrscheinliche Hybridisierungsstellen mit der humanen cDNS-Sequenz wurden oben dargestellt und entsprechen dem erwarteten Produkt

9.2 Patientendaten

Im folgenden sind die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (σ) der untersuchten Komponenten in der Patientengruppe (n=48) zusammengefaßt.

Geschl.	Geschlecht
Binet:	Einteilung der Patientengruppe nach Binet
Leuk. x10e3	Leukozytenanzahl in Tausend
CD73:	Aktivität der CD73 (nmol/h x 10 ⁶ Zellen)
A1AdoR-A3AdoR:	Relative cDNS-Niveaus der AdoR
ADA und c-myc:	Densitometrische Auswertung der cDNS-Signale der entsprechenden Komponenten
CD3	T-Zellrezeptor
CD4	akzessorisches Molekül bei der MHC-Erkennung: T-Helferzelle
CD5	B-Zellrezeptor
CD8	akzessorisches Molekül bei der MHC-Erkennung: cytotoxische T-Zelle
CD19	Komponente des BCR-Signaltransduktionskomplexes
CD22	Zelladhäsions-Molekül
CD23	niedrigaffiner IgE-Rezeptor

	Geschl.	Alter	Binet	CD73- Test	Leuk. x10e3	CD73		ADA		c-myc	
						MW	σ	MW	σ	MW	σ
C01	m	68	B	09.05.97	36,1	0,21	0,05	1695,69	317,98	464,59	135,13
C02	m	79	A	05.06.97	22,3	0,24	0,11	3284,58	345,87	1248,07	32,14
C03	w	56	A	12.06.97	39,2	1,3	0,04	2882,16	269,64	1319,77	45,24
C04	w	68	B	17.07.97	199,3	0,06	0,04	2622,38	786,71	753,21	109,26
C05	w	74	C	31.07.97	61,9	0,14	0,01	3082,21	924,66	1352,29	204,14
C06	w	76	A	27.10.97	15	5,94	0,99	1343,14	402,94	598,89	42,77
C07	m	88	A	27.10.97	12,6	0,51	0,12	2968,02	890,41	1194,89	172,08
C08	m	58	C	30.10.97	17	0,46	0,03	3989,51	1196,9	2176,77	408,67
C09	w	65	A	03.11.97	47,4	0,16	0,08	4602,84	1380,9	2383,7	248,25
C10	m	78	C	03.11.97	150	5,03	0,24	4608,63	1382,6	1110,98	85,21
C11	w	77	A	14.11.97	32,8	1,6	0,28	3769,33	1130,8	2133,05	45,67
C12	w	49	A	25.11.97	80,1	0,09	0,02	5576,34	1672,9	2089,83	168,22
C13	m	65	A	25.11.97	68,3	0,22	0,02	4805,61	1441,7	2939	458,99
C14	m	62	IV	25.11.97	8,7	0,04	0,06	3684,83	1105,5	858,67	722,55
C15	m	56	B	01.12.97	96	0,11	0,05	3837,13	1151,1	1811,31	1703,6
C16	m	61	B	01.12.97	87,4	0,23	0,13	3832,89	1149,9	1901,35	1572,3
C17	w	52	A	08.01.98	21,6	5,13	0,47	5357,14	1607,1	1889,28	1512,3
C18	m	66	A	08.01.98	47	0,22	0,04	5250,38	1575,1	2553,33	1546,8
C19	w	54	B	15.01.98	39	0,12	0,07	3424,62	1027,4	1100,66	252,88
C20	m	65	A	19.01.98	123	2,74	1,24	4913,51	1474,1	2165,95	413,76
C21	m	75	A	19.01.98	28,4	0,34	0,3	2669,33	800,8	1024,14	328,47
C22	w	62	A	22.01.98	23,4	0,28	0,03	2849,98	854,99	1427,15	739,87
C23	m	88	C	22.01.98	197,2	0,18	0,12	2277,67	683,3	509,06	152,02
C24	m	51	A	23.01.98	19	1,7	0,37	8880,47	2664,1	2466,67	864,55
C25	w			02.02.98		3,06	0,85	1902,01	570,6	881,47	262,2
C26	w	78	A	06.02.98	66,6	0,63	0,18	4154,9	1246,5	1440,42	174,25
C27	m	57	B	10.02.98	15,3	4,53	1,29	3815,85	1144,8	1536	688,46
C28	w	74	C	13.02.98	145	0,19	0,02	4813,88	357,51	1155,19	680,3
C29	m	67	C	17.02.98	31,8	1,13	0,02	1901,2	454,38	3556,42	118,39
C30	m	64	B	16.04.98	4	3,24	0,74	2313,74	9,33	1086,98	58,66
C31	w	78	A	27.04.98	27,4	0,31	0,08	3917,36	1175,2	2961,53	230,4
C32	w	58	A	27.04.98	3,6	6,87	2,6	2610,95	783,29	1042,86	84,85
C33	m	48	A	27.04.98	58,9	0,72	0,26	4293,6	1288,1	2525,44	555,73
C34	w	65	C	22.10.98	10,9	3,56	0,64	2427,05	728,12	2209,66	340,23
C35	w	54	B	19.11.98	39	0,24	0,03	2116,97	635,09	1403,4	47,68
C36	w	79	A	05.02.99	118	0,41	0,3	2884,58	865,37	2315,33	143,42
C37	m	41	B	09.02.99	11,9	1,39	0,16	4234,01	1270,2	1176,4	0,29
C38	w	50	C	09.02.99	90	0,58	0,03	3744,86	1123,5	1831,84	30,5
C39	m	47	C	09.02.99	9,4	15,34	1,44	3944,37	1183,3	1061,7	55,37
C40	w	71	A	13.04.99	27	12,06	2,67	2661,94	798,58	1851,91	373,66
C41	m	63	B	20.04.99	85	9,91	2,49	4927,89	1478,4	2934,72	761,28
C42	m	89	B	19.05.99	74,7	0,38	0,01	3896,9	1169,1	1429,84	393,48
C43	w	63	A	27.05.99	30,9	0,31	0,08	3451,4	1035,4	1858,08	197,78
C44	m	56	A	27.05.99	19	1,28	0,25	5615,34	1684,6	2411,27	216,76
C45	m	62	C	02.06.99	72,1			6730,59	2019,2	2197,92	211,81
C46	m							6278,77	1883,6	2443,79	30,59
C47	m	63	B	22.06.99	47,9			4687,1	1406,1	3212,06	629,59
C48	w	42	A	08.02.00	18,3			10273,29	3082	3964,1	216,2

Tab. 19: Überblick über die Patientendaten a). Geschlecht, Alter, Binet, CD73-Aktivität und densitometrische Auswertung der ADA und c-myc-cDNS-Signale.

	A1AdoR		A2aAdoR		A2bAdoR		A3AdoR	
	MW	σ	MW	σ	MW	σ	MW	σ
C01	0,96	0,08	2,48	1,53	0,25	0,06	0,67	0,34
C02	1,6	0,23	3,48	0,47	0,7	0,47	0,55	0,07
C03	1,41	0,18	2,95	0,95	0,46	0,24	0,43	0,19
C04	0,64	0,45	1,62	0,5	0,46	0,17	0,31	0,18
C05	1,82	1,69	2,14	1,6	0,54	0,4	0,88	0,57
C06	0,89	0,03	1,71	1,21	0,55	0,53	0,33	0,19
C07	1,26	0,56	2,42	0,71	0,59	0,26	0,54	0,15
C08	2,11	0,75	3,5	0,6	1,39	1,04	0,95	0,43
C09	1,73	0,47	2,47	1,68	0,88	1,21	0,43	0,32
C10	0,85	0,12	1,63	0,97	0,91	0,58	0,26	0,27
C11	1,52	0,2	3,07	1,31	0,49	0,23	0,47	0,31
C12	1,62	0,52	1,98	1,28	0,71	0,36	0,47	0,46
C13	2,21	0,67	2,74	2,11	0,75	0,3	0,55	0,42
C14	1,53	0,22	2,36	0,87	0,43	0,3	0,48	0,15
C15	2,44	1,8	1,64	0,28	0,87	1,17	0,44	0,31
C16	1,61	0,56	2	0,4	0,97	1	0,85	0,3
C17	2,42	0,7	2,35	0,7	1,12	1,14	1,1	0,16
C18	2,26	0,7	2,22	0,66	0,8	0,92	1,22	0,99
C19	1,04	0,18	1,33	0,3	0,45	0,2	1,02	0,96
C20	1,77	0,21	3,12	1	0,73	0,23	0,52	0,27
C21	1,35	0,55	2,29	0,41	0,27	0,1	0,32	0,08
C22	2,22	0,68	2,32	0,71	0,22	0,16	0,76	0,3
C23	0,8	0,3	0,7	0,3	0,27	0,14	0,17	0,09
C24	3,54	1,1	2,15	0,47	1,17	0,8	1,73	0,04
C25	1,7	0,54	2,69	0,83	0,27	0,17	0,67	0,31
C26	1,94	0,73	3,65	0,66	0,43	0,28	0,42	0,18
C27	2,47	0,64	6,08	0,98	0,87	0,97	0,63	0,1
C28	0,97	0,41	0,63	0,1	0,34	0,25	0,54	0,69
C29	0,99	0,44	1,53	0,46	0,36	0,42	0,51	0,26
C30	1,12	0,42	1,49	0,52	0,5	0,57	0,67	0,63
C31	1,21	0,46	3	1,24	0,39	0,19	0,56	0,24
C32	1,22	0,36	2,3	1,03	0,48	0,46	1,05	0,93
C33	1,7	1,45	3,36	2,53	0,45	0,12	0,6	0,26
C34	1,54	0,76	3,28	1,6	0,29	0,19	0,96	0,42
C35	0,77	0,72	2,15	1,2	0,18	0,06	0,4	0,02
C36	3,97	2,95	1,7	1,16	0,45	0,22	0,7	0,51
C37	0,46	0,42	2,01	0,75	0,49	0,44	0,17	0,09
C38	1,88	0,74	2,48	1,5	0,44	0,21	1,66	1,61
C39	1,26	0,56	2,4	1,01	0,33	0,21	0,13	0,08
C40	0,94	0,25	1,11	0,11	0,43	0,22	0,65	0,34
C41	2,89	0,78	2,72	1,65	0,49	0,22	0,68	0,07
C42	1,09	0,11	1,34	0,69	0,13	0,03	0,33	0,21
C43	1,27	0,44	1,8	1,46	0,16	0,07	0,37	0,14
C44	1,52	0,2	2,03	1,17	0,27	0,06	0,42	0,13
C45	1,29	0,01	1,33	0,59	0,37	0,13	1,05	0,5
C46	1,08	0,15	2,37	0,73	0,19	0,12	0,97	0,1
C47	1,44	0,18	1,43	0,22	0,41	0,1	0,97	0,29
C48	1,47	0,19	3,4	1,27	0,49	0,39	0,76	0,27

Tab. 20: Überblick über die Patientendaten b). Relative cDNS-Niveaus der 4 AdoR-Subtypen, gemessen mit semiquantitativer RT-PCR.

	CD5	CD3	CD4	CD8	CD19	CD22	CD23	CD5/CD19
C01	97	8	5	3	91	0	88	90
C02	97				93	1	59	
C03								
C04	58	2	1	1	98	29	65	57
C05	90	9	6	3	91	90	87	81
C06	90	21	16	5	76	0	75	70
C07	96	11	4	7	87	85	5	85
C08	90	17	8	9	79	0	40	72
C09	80	7	8	4	85	0	70	
C10	95	14	12	2	82	21	81	81
C11								
C12	98	2	1	1	99	1	80	97
C13	89	1	1	1	98	0	51	88
C14	88	10	5	6	78	0	30	77
C15	99	1	1	1	97	43	83	96
C16	100	10	8	2	89	0	89	89
C17	99	4	2	2	96			96
C18	70				93	2	50	
C19	94	1	1	1	99	0	91	93
C20								
C21	31	4	2	2	94	1	74	28
C22	96	2	1	1	96	0	92	94
C23	3				50	0	1	
C24	82	11	5	6	74	35	64	71
C25								
C26	96	8	5	3	90	1	90	87
C27	93	20	14	5	77	0	72	73
C28	80	50	39	11	31	0	31	31
C29	95	6	3	4	89	1	90	88
C30	47	46	24	23	17	17	2	1
C31	99	7	6	1	94	2	76	94
C32								
C33								
C34	94	42	14	27	55	51	52	55
C35	100	1	1	0	99	0	99	99
C36	96	5	3	1	92	0	92	92
C37	93	40	29	12	54		50	50
C38	2	2	1	1	98	96	53	1
C39	96	56	38	14	45	0	36	45
C40	80	7	5	2	88	15	75	73
C41								
C42	98	3	2	2	98	0	95	96
C43								
C44	94	14	10	5	94	34	71	80
C45	99	4	2	2	97	0	96	98
C46	52	46	31	17	19	0	8	6
C47								
C48	95	23	15	8	74	2	71	72

Tab. 21: Überblick über die Patientendaten c). Distribution der Leukozyten-Oberflächenmarker (CD) in % der Leukozyten-Gesamtpopulation.

9.3 Daten der Kontrollgruppe

Im folgenden sind die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (σ) der untersuchten Komponenten in der Kontrollgruppe (n=10) zusammengefaßt.

Geschl.: Geschlecht

A1AdoR-A3AdoR: Relative cDNS-Niveaus der AdoR

ADA und c-myc: Densitometrische Auswertung der cDNS-Signale der entsprechenden Komponenten

	Geschl.	Alter	A1AdoR		A2aAdoR		A2bAdoR		A3AdoR	
			MW	σ	MW	σ	MW	σ	MW	σ
HD	w	51	0,77	0,27	2,03	1	0,43	0,18	0,42	0,09
M	w	25	0,8	0,24	1,84	1,13	0,2	0,03	0,63	0,19
Z	w	34	1,11	0,16	1,62	0,45	0,4	0,18	0,61	0,29
F	w	32	1,13	0,08	1,56	0,41	0,43	0,18	0,54	0,27
RG	m	27	0,66	0,13	1,05	0,41	0,39	0,13	0,66	0,13
K	m	33	0,87	0,68	0,81	0,21	0,34	0,1	0,66	0,38
N	m	30	1,96	0,66	3,12	0,52	0,41	0,08	0,62	0,37
NS	m	27	0,98	0,4	1,13	0,6	0,34	0,19	0,72	0,58
G	m	62	1,54	0	2,39	0,64	0,45	0,01	0,67	0,22
S	w	25	0,93	0,28	1,85	0,93	0,3	0,13	0,55	0,27

Tab. 22: Überblick über die Kontrolldaten a). Geschlecht, Alter und relative cDNS-Niveaus der 4 AdoR-Subtypen, gemessen mit semiquantitativer RT-PCR.

	ADA		c-myc	
	MW	σ	MW	σ
HD	2032,53	609,76	1123,13	372,79
M	2397,38	719,21	1341,58	752,91
Z	3054,77	916,43	2062,01	509,58
F	3120,14	936,04	1736,32	457,25
RG	2243,23	672,97	1400,84	27,65
K	1458,53	437,56	797,67	484,98
N	4218,2	137,13	1650,63	206,96
NS	3264,13	1976,65	1523,23	318,19
G	5569,54	1545,67	2035,33	79,27
S				

Tab. 23: Überblick über die Kontrolldaten b). Densitometrische Auswertung der ADA und c-myc-cDNS-Signale.

9.4 Meßdaten der 493-6-Zelllinie

σ	Standardabweichung
493-6 1	c-myc+/EBNA2+
493-6 2	c-myc-/EBNA2+
493-6 3	c-myc+/EBNA2-
493-6 4	c-myc-/EBNA2-
ADA	Adenosin-Desaminase-mRNS-Niveau
cAMP	cyclo-AMP (pmol/10 ⁷ Zellen)
CD73	CD73-mRNS-Niveau

CGS
NECA

CGS21680; selektiver A2aAdoR-Agonist
Ado-Agonist

	A1AdoR	σ	A2aAdoR	σ	A2bAdoR	σ	A3AdoR	σ
493-6 1	0,16	0,05	1,05	0,03	0,35	0,14	0,04	0,01
493-6 2	0,36	0,2	2,35	0,15	0,74	0,19	0,08	0,06
493-6 3	0,12	0,07	1,11	0,88	0,25	0,11	0,03	0
493-6 4	0,18	0,08	1,1	0,76	0,46	0,01	0,04	0,01

Tab. 24: Relative cDNS-Niveaus der AdoR-Subtypen in den 4 Induktionszuständen der 493-6-Zelllinie in abnehmender Mitogen-Signalstärke (Abb. 47a).

	ADA	CD73	c-myc
493-6 1	7449,64	5753,28	7473,72
493-6 2	5172,11	5937,89	3659,47
493-6 3	4620,42	6085,34	6300,52
493-6 4	4274,59	9788,52	7273,77

Tab. 25: Relative cDNS-Niveaus der ADA, CD73 und c-myc-Gene in den 4 Induktionszuständen (Abb. 47b).

	A1AdoR	A2aAdoR	A2bAdoR	A3AdoR
1n3 0h	0,88	2,3	0,34	0,11
1n3 3h	1,07	3,63	0,76	0,2
1n3 6h	1,25	5,25	0,58	0,28
1n3 1d	0,54	2,64	0,24	0,11

Tab. 26: Relative cDNS-Niveaus der AdoR-Subtypen im zeitlichen Verlauf nach der Abschaltung des EBNA2-Gens (c-myc +; 1 nach 3; Abb. 48a).

	ADA	CD73	c-myc
1n3 0h	7705	641	6313
1n3 3h	7501	466	2484
1n3 6.5h	7447	111	7292
1n3 9h	7027	2738	3164
1n3 1d	7602	1339	1558

Tab. 27: Relative cDNS-Niveaus der ADA, CD73 und c-myc-Gene im zeitlichen Verlauf nach der Abschaltung des EBNA2-Gens (c-myc +; Abb. 48b).

	A1AdoR	σ	A2aAdoR	σ	A2bAdoR	σ	A3AdoR	σ
2n4 0h	0,3	0,03	0,33	0,09	0,3	0,03	0,07	0,04
2n4 6h	0,37	0,03	0,56	0,29	0,42	0,11	0,09	0,01
2n4 1d	0,29	0,02	0,98	0,01	0,29	0	0,23	0,01

Tab. 28: Relative cDNS-Niveaus der AdoR-Subtypen im zeitlichen Verlauf nach der Abschaltung des EBNA2-Gens (c-myc -; 2 nach 4 ;Abb. 49a).

	A2aAdoR	ADA	CD73	c-myc
2n4 0h	0,07	245,64	41,32	120,07
2n4 3h	0,18	340,42	20,78	141,69
2n4 6h	0,17	378,47	200,43	120,63
2n4 1d	0,27	564,97	165,88	341,19

Tab. 29: Relative cDNS-Niveaus der A2aAdoR, ADA, CD73 und c-myc-Gene im zeitlichen Verlauf nach der Abschaltung des EBNA2-Gens (c-myc -; 2 nach 4 ;Abb. 49b).

	CD73	A2aAdoR	ADA
493-6 1	0,2	0,34	0,95
493-6 2	1,24	0,71	1,24
493-6 3	0,75	0,29	0,31
493-6 4	1,12	0,81	0,43

Tab. 30: Densitometrische Auswertung der Northern-Blot-Analyse der CD73-, A2aAdoR- und ADA-mRNS-Niveaus, abgeglichen über die 18S/28S-rRNS-Banden (Abb. 51).

	NECA	CGS
493-6 1	101	127
493-6 2	253	278
493-6 3	2119	4340
493-6 4	3965	2360

Tab. 31: cAMP-Niveaus (pmol pro 10^7 Zellen) der 4 Induktionszustände nach 5-minütiger Stimulierung mit NECA bzw. CGS21680 in Gegenwart von Ro 20-1724 (Abb. 52).

	cAMP
1n4 K	82
1n4 7h	68
1n4 1d	653
1n4 2d	454

Tab. 32: Zeitlicher Verlauf der maximal mit NECA stimulierbaren cAMP-Niveaus nach Abschaltung der EBNA2- und c-myc-Transkription (1 nach 4; Abb. 53)

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Rudolf-Markus Napieralski
geboren am: 17.12.69
in: München
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildungsdaten:

Schulausbildung:

1976 - 1980 Besuch der Grundschule am Strehleranger 4 in München
1980 - 1989 Besuch des Werner von Siemens Gymnasiums in München
Juni 1989 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife
Juni 1989 bis September 1990 Absolvierung des Wehrdienstes

Studium:

1990 - 1993 Grundstudium der Chemie an der LMU-München
1993 - 1996 Hauptstudium der Chemie an der LMU-München mit Wahlfach Biochemie
Februar 1996 Ablegen der Diplom-Hauptprüfung
März 1996 bis November 1996 Durchführung der Diplomarbeit in der Abteilung „Molekulare Strukturbioogie“ (Prof. Dr. W. Baumeister) des Max-Planck-Institutes für Biochemie Mit dem Titel: „Aufklärung der Gensequenz eines ABC-Typ-Transportproteinkomplexes von *Thermoplasma acidophilum* und Konstruktion eines Expressionssystems“

Juni 97 bis Juli 01

Durchführung der Doktorarbeit in der Abteilung
„Biochemische Humangenetik“
(Prof. W. Gutensohn)
des Instituts für Anthropologie und
Humangenetik